

Université de Sherbrooke

Rôle du GM-CSF dans les maladies inflammatoires intestinales : maladie de Crohn

Par
Rémy Pépin
Programme d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
juin 2017

Membres du jury d'évaluation
Abdelaziz Amrani, programme d'Immunologie
Claire Dubois, programme d'Immunologie
Alfredo Menendez, programme de Microbiologie

© Rémy Pépin, 2017

Ad astra per aspera

RESUME

Rôle du GM-CSF dans les maladies inflammatoires intestinales : maladie de Crohn

Par
Rémy Pépin
Programme d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de [maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui est idiopathique, cyclique et incurable. Étant donné l'absence de connaissance de l'étiologie de la maladie, il est nécessaire d'approfondir les connaissances fondamentales sur la maladie de Crohn. Dans ce travail, nous avons étudié l'implication d'une cytokine, le GM-CSF, dans le développement d'une pathologie intestinale similaire à la maladie de Crohn chez la souris C57Bl/6. Pour réaliser cet objectif, nous avons généré des souris déficientes en GM-CSF immunocompétentes ou immunodéficientes que nous avons caractérisé et validé en tant que modèle animal de la maladie de Crohn. Les résultats de notre étude ont mis en évidence le rôle pathologique de l'absence du GM-CSF chez les souris déficientes en système immunitaire. En effet, l'absence du GM-CSF induit une maladie chronique et cyclique avec un profil de développement similaire à la maladie de Crohn tel que démontré par les analyses en pathologie de l'intestin et du côlon. De plus, l'étude des populations cellulaires a montré une augmentation du nombre de macrophage, de neutrophiles et de DCs chez les souris déficientes en GM-CSF et en système immunitaire adaptatif comparativement aux souris contrôles. De surcroît, une hausse drastique de cytokines pro-inflammatoires est notée chez ces souris. De plus, l'absence du GM-CSF ne semble pas modifier les populations lymphocytaires intestinales et colonique. En conclusion, l'absence du GM-CSF semble potentialiser les lésions observées dans les intestins des souris déficientes en système immunitaire adaptatif, ce qui suggère que la maladie de Crohn serait une maladie d'immunodéficience primaire.

Mots clés : souris, C57Bl/6, GM-CSF, auto-immunité, maladie de Crohn, inné

TABLE DES MATIERES

Résumé	iii
Table des matières	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction	1
Description du contexte pathologique de la maladie de Crohn	1
Le système immunitaire : le cheval de guerre de la maladie de Crohn	3
Physiologie et rôle des principaux organes touchés par la maladie de Crohn:	
l'intestin grêle et le côlon.....	6
Microbiome du tractus intestinal.....	10
Consensus de la pathogénèse de la maladie de Crohn.....	13
Piste de recherches actuelles pour l'élaboration de traitement pour la maladie de Crohn	14
Cellules dendritiques et maladie de Crohn.....	20
Les innate lymphoid cells : un nouveau regard sur la maladie de Crohn	23
Régulation et fonctions du GM-CSF.....	25
Potentiel thérapeutique du GM-CSF.....	27
Connaissances et origine du projet.....	29
Hypothèse/problématique.....	32
Le GM-CSF promeut la tolérance immunitaire intestinale envers le microbiome.....	32
Objectifs	32
Matériel et méthodes	33
1. Modèles murins, génotypage et suivi du poids des animaux	33
2. Histologie.....	34
3. Isolation des cellules immunitaires de la <i>lamina propria</i>	35
4. Cytométrie en flux	35
5. PCR quantitative en temps réel (qPCR)	36
2. Évaluation de l'inflammation intestinale.....	37
6 Logiciel d'analyse statistique	38
Résultats	39

1. Suivi et analyses des souris déficientes en GM-CSF.....	39
1.1 Étude de la survie et du gain de poids	39
1.2 Étude phénotypique de l'inflammation intestinale.	42
2. Étude histopathologique intestinale et colonique	44
3. Étude des facteurs de confusion	46
3.1 Étude de la présence d'un pathogène.....	46
3.2 Étude histopathologique pulmonaire	49
4. Étude des populations cellulaires immunitaires intestinales et coloniques	52
4.1 Étude des populations de DCs intestinales et coloniques	52
4.2 Nombre de neutrophiles intestinaux et coloniques	54
4.3 Nombre absolu de macrophages intestinaux et coloniques	56
4.4 Étude des populations lymphocytaires intestinales et coloniques	59
4.5 Niveaux d'expression de cytokines intestinale	63
4.6 Niveaux d'expression de cytokines intestinale	67
Discussion	70
Conclusion.....	85
Mot de la fin : forces et faiblesses du projet	85
Liste des références	87
Annexes	105

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la maladie de Crohn	2
Figure 2 : Schéma de la structure intestinale et colonique	7
Figure 3 : Les souris C57BL/6 déficientes en GM-CSF ont un gain de poids diminué et meurent de façon significative comparativement aux souris contrôles	41
Figure 4 : Évaluation de l'index de l'activité de la maladie (DAI) chez les différents génotypes de souris C57BL/6.....	44
Figure 5 : Les souris C57BL/6 <i>Csf2</i> ^{-/-} <i>Rag1</i> ^{-/-} développent de larges foyers d'inflammation intestinale et colonique.....	45
Figure 6 : Les souris C57BL/6 déficientes en GM-CSF ont un gain poids diminué et meurent de façon significative comparativement aux souris contrôles en absence de pathogène.....	49
Figure 7: Les souris C57BL/6 <i>Csf2</i> ^{-/-} <i>Rag1</i> ^{+/+} et <i>Csf2</i> ^{-/-} <i>Rag1</i> ^{-/-} ont des larges foyers d'inflammation pulmonaire.....	51
Figure 8 : Évaluation des proportions des populations de cellules dendritiques intestinales et coloniques ainsi que leur nombre absolu des différents génotypes de souris C57BL/6.....	54
Figure 9 : Évaluation du nombre absolu de neutrophiles intestinales et coloniques des différents génotypes de souris C57BL/6.....	56
Figure 10 : Évaluation du nombre absolu de macrophages intestinales et coloniques des différents génotypes de souris C57BL/6 : les souris <i>Csf2</i> ^{+/+} <i>Rag1</i> ^{-/-} et <i>Csf2</i> ^{-/-} <i>Rag1</i> ^{-/-} ont significativement plus de macrophages dans l'intestin et le côlon.....	58
Figure 11 : Évaluation des différentes populations lymphocytaires intestinales des génotypes de souris C57BL/6 immunocompétents.....	61
Figure 12 : Évaluation des différentes populations lymphocytaires coloniques des génotypes de souris C57BL/6 immunocompétents.....	63
Figure 13 : Évaluation des niveaux d'expression intestinale de différents gènes de cytokines typiquement sécrétées par les DCs des différents génotypes de souris C57BL/6.....	66
Figure 14 : Évaluation des niveaux d'expression colonique de différents gènes de cytokines typiquement sécrétées par les DCs des différents génotypes de souris C57BL/6.....	69
Figure 15 : Montage photographique représentatif des lésions chez les souris C57BL/6. <i>Csf2</i> ^{-/-} . <i>Rag1</i> ^{-/-}	105

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : DETAILS DU PROTOCOLE DE GENOTYPAGE DES SOURIS <i>Csf2.RAG1</i>	34
TABLEAU 2 : DETAILS DES ANTICORPS UTILISES POUR LA CYTOMETRIE EN FLUX.....	36
TABLEAU 3 : DETAILS DES CONDITIONS DE QPCR DES GENES D'INTERETS	37
TABLEAU 4 : DETAILS DE L'EVALUATION DE L'INFLAMMATION INTESTINALE	38

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT	protéine kinase B
BMDC	bone marrow-derived dendritic cells (Cellules dendritiques induites à partir de cellules de moelle osseuse)
CARD	Caspase activation and recruitment domains related protein (Protéines ayant un domaine d'activation et de recrutement des caspases)
CCR7	C-C chemokine receptor type 7 (Récepteur de la chimiokine CCR7)
CD	Cluster of différenciation (marqueur afin de distinguer les types cellulaires), par exemple CD40 et CD103
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Csf	Colony stimulating factor (Facteur de croissance de colonies hématopoïétique) ou encore gène du GM-CSF.
DC	Dendritic cell (Cellule dendritique)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Milieu de culture)
DSS	Dextran sodium sulfate (Dextran Sulfate de Sodium)
FBS	Foetal bovine serum
FODMAP	Fermentable, Oligo-, Di-, Mono-saccharides And Polyols (Sucres fermentables à complexité variable)
FOXP3	Forkhead box P3 (Facteur de transcription)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Facteur de croissance de colonies hématopoïétique stimulant la croissance des granulocytes et des macrophages)
GR1	Granulocyte receptor 1 (Récepteur 1 classique des granulocytes)
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN	Interféron
Ifngr2m	Interferon gamma receptor 2 murine (Récepteur 2 de l'interféron gamma murin)
IL	Interleukine
IL23R	Récepteur de l'interleukine 23
IL-27R α	Sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine 27
ILC	Innate lymphoid cell
iTreg	Lymphocyte T régulateur induit
JAK	Janus kinase
LPS	Lipopolysaccharide
NCR	Natural cytotoxicity receptor (Récepteur classique des cellules tueuses naturelles (NK))
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer (Cellule tueuse naturelle)
NKp46	Naturalkiller protein 46 (Antigène numéro 46 des cellules tueuses naturelles)
NOD	Non-obese diabetic mouse (Souris dont le diabète n'est pas induit)

	par l'obésité)
nTreg	Lymphocyte T régulateur naturel
PBS	Phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin)
PD-L1	Programmed death-ligand 1 (Ligand numéro 1 inducteur de mort cellulaire)
PGE-2	Prostaglandine E2
Pi3K	Kinase phosphoinositide-3
PTPN22	Tyrosine protein phosphatase non receptor type 22 (Phosphatase non associé au récepteur numéro 22)
RAG	Recombination-activating gene (Protéine du gène activant la recombinaison VDJ)
SCFA	Short chain fatty acid (Acide gras à chaîne courte)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polymorphisme d'un seul nucléotide)
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling protein 1 (Protéine suppressive de signalisation des cytokines)
SPF	Specific pathogen free (Exempt de pathogènes spécifiques)
STAT	Signal transducers and activators of transcription (Protéine transductrice activatrices de la transcription)
TAP1	Transporter associated with antigen processing (Transporteur associé à la présentation antigénique)
TGF- β	Transforming growth factor beta (Facteur de croissance transformant)
T _H	Lymphocyte T Helper (Lymphocyte T auxiliaire)
TLR	Tool like receptor (Récepteur de type Tool)
TNF- α	Tumor necrosis factor (Facteur de nécrose tumorale)
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TYK2	Tyrosine kinase 2

INTRODUCTION

Description du contexte pathologique de la maladie de Crohn

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui est idiopathique, cyclique et incurable. Ainsi, cette maladie se caractérise par l'apparition de zones inflammatoires à localisation stochastique pouvant se manifester à un endroit où un autre du tractus intestinal pendant un temps indéfini pour ensuite disparaître un certain temps et puis ressurgir, répétant le cycle pour la durée de vie de l'individu (**Figure 1**) (Van Assch *et al.*, 2010). La présentation clinique de la maladie de Crohn se caractérise par des douleurs abdominales, de la diarrhée, une augmentation de la perméabilité intestinale, ainsi que par la présence de cycles irréguliers de maladie. Histologiquement, les zones enflammées se présentent sous la forme d'inflammation transmurale aboutissant à la formation d'abcès, de fistules ou de fissures de l'organe touché (Panes *et al.*, 2007). La maladie de Crohn est fréquemment accompagnée de saignements, de fièvre ou de vomissements. Conséquemment, l'état général de santé du patient se dégrade ce qui se traduit par une perte de poids, une malnutrition, un état de fatigue permanent et des troubles psychologiques et sociaux (Ghazi, 2016). Ainsi, la maladie de Crohn est une maladie complexe ayant une forte dimension inflammatoire.

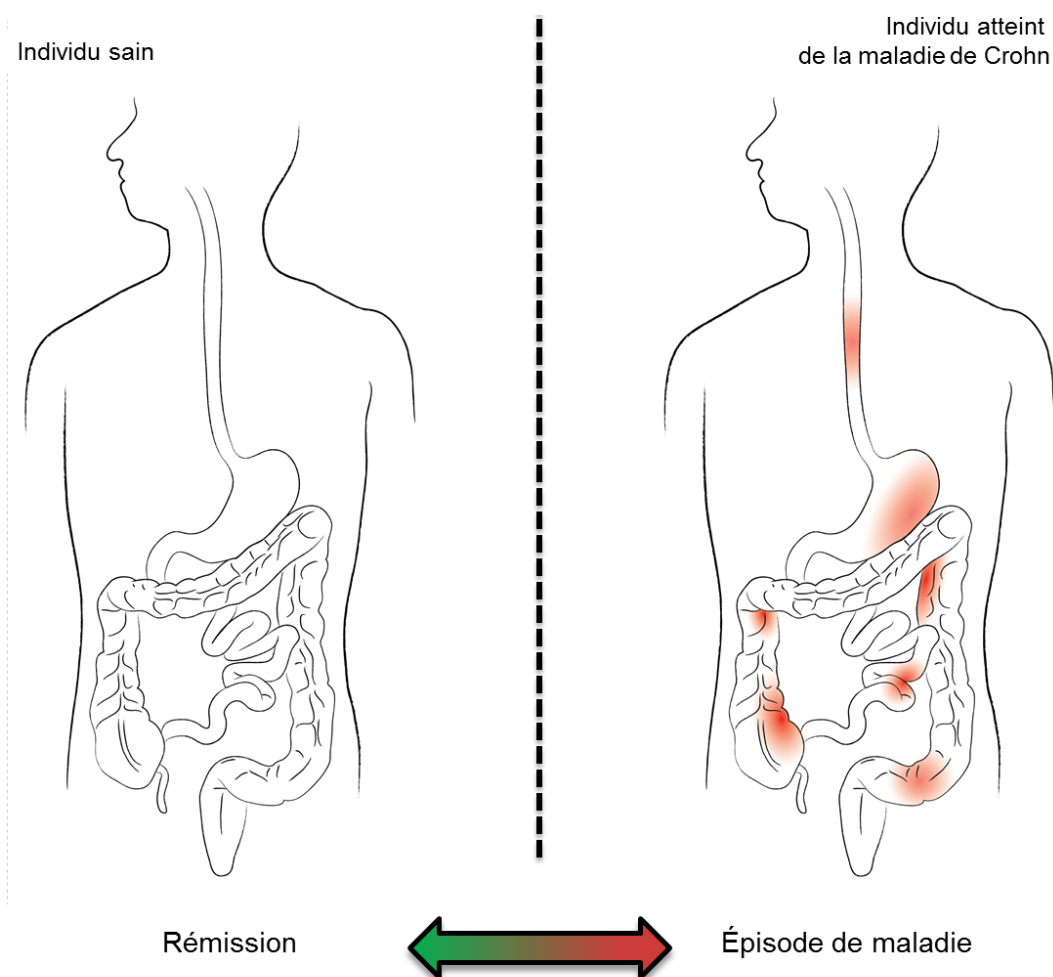


Figure 1 : Représentation de la maladie de Crohn.

Les individus atteints de la maladie ont des zones d'inflammations locales récurrentes dispersées le long du tractus intestinal. Ainsi, les malades vont alterner entre un état sain et malade dont les épisodes de maladie seront plus longs et plus sévères. Dessin de Samuel Paul sous la direction de l'auteur.

La maladie de Crohn affecte 0,6 % de la population canadienne, ce qui est équivalent au nombre de canadiens atteints de diabète de type 1 et trois fois supérieur au nombre de canadiens atteints par la sclérose en plaque (Fondation canadienne des MII, 2008). Mondialement, le Canada est le pays recensant le deuxième plus de cas de maladie de Crohn après le Danemark (Cosnes *et al.*, 2011). De plus, avec 27466 cas recensés en 2008, le Québec se classe en

deuxième position après l'Ontario en ce qui concerne la prévalence de la maladie au Canada (Fondation canadienne des MII, 2008).

Malgré sa première description en 1932 par le Dr Crohn et ses collègues (Crohn *et al.*, 1932), il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif à la maladie (Cheifetz, 2013). Les approches présentement disponibles sont la prise d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens tels que la mésalazine, la résection chirurgicale des zones pernicieuses et l'utilisation d'antibiotique dans les cas d'infection par une bactérie pathogène intraluminale (*Clostridium difficile* étant l'exemple de pathogène le plus fréquent) ou intracorporelle. Il est à noter qu'il existe des traitements expérimentaux plus «agressif» afin de réguler l'inflammation lorsque la maladie s'aggrave. Il y a, en outre, les immunomodulateurs tels que le méthotrexate, ou encore plus agressif, les traitements biologiques tels que les anticorps anti-TNF- α (Fondation canadienne des MII, 2008).

Présentement, la maladie de Crohn est une préoccupation alarmante pour la société. En effet, sa manifestation chronique, son incurabilité ainsi que son incidence en augmentation (à un rythme ne pouvant s'expliquer par l'augmentation de la population, ce qui suggère un facteur de cause environnemental) (Ko *et al.*, 2014), en fait un sujet scientifique d'étude foisonnant.

Le système immunitaire : le cheval de guerre de la maladie de Crohn

Le système immunitaire est au cœur de la pathophysiologie de la maladie de Crohn. Avant d'aborder le contexte de la maladie de Crohn, il est essentiel de connaître les fondements du système immunitaire. Le système immunitaire permet de discriminer le non-soi du soi et d'élaborer une défense adéquate adaptée à l'ennemi rencontré. Développées à partir des cellules souches hématopoïétiques, les cellules immunitaires sont les principaux médiateurs de l'élaboration de cette défense contre les agents pathogènes. Ces cellules sont divisées en deux grandes

catégories, soit les cellules du système immunitaire inné et les cellules du système immunitaire adaptatif. L'activation de l'un ou des deux systèmes immunitaires engendre un phénomène connu sous le terme de réponse immunitaire. Tandis que le système immunitaire inné va gérer les altérations mineures, le système immunitaire adaptatif sera recruté en renfort contre les pathogènes plus résistants. Le système adaptatif, composé de lymphocytes B et de lymphocytes T est conséquemment la mémoire et la logistique contre les pathogènes spécifiques (Parham, 2009).

Le système immunitaire est conçu d'une façon telle qu'il a le potentiel de s'attaquer à toutes les cellules porteuses d'antigènes dans sa sphère d'activité, les cellules du soi y comprises. Afin d'éviter le développement de réaction auto-immunitaire menant au développement de maladies auto-immunes, le corps humain a mis en place des mécanismes de tolérance immunitaire du soi, connus respectivement sous le terme de tolérance centrale et de tolérance périphérique (Parham, 2009).

La tolérance centrale se produit lors du développement des lymphocytes B et T et se déroule en deux étapes : la sélection positive et la sélection négative. Il est à noter que les lymphocytes B sont seulement sujets à la sélection négative. La tolérance centrale associée aux lymphocytes T se déroule dans le thymus, tandis que la tolérance centrale associée aux lymphocytes B s'effectue dans la moelle osseuse. Néanmoins pour les deux types cellulaires, la sélection négative s'exécute d'une façon similaire (Parham, 2009).

Ainsi, la sélection positive des lymphocytes T accomplie dans le cortex du thymus permet de sélectionner les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ ayant un potentiel effecteur (étant donné que les mécanismes de sélection associés ne sont pas nécessaires à la compréhension du mémoire, ceux-ci ne seront pas approfondis plus en détail). Les cellules non-sélectionnées seront éliminées par apoptose. Une fois dans la médulla du thymus, les lymphocytes T vont être en contact avec les antigènes du soi, présentés par les cellules dendritiques, et les cellules épithéliales médullaires.

Dans le cas où les lymphocytes reconnaissent les antigènes du soi présentés dans la médulla, ces lymphocytes auto-réactifs sont éliminés (Parham, 2009).

Malgré le fait que la tolérance centrale soit un phénomène excessivement efficace pour la sélection négative, il survient de rares cas où des lymphocytes auto-réactifs réussissent à outrepasser ce système. Des mécanismes de protection supplémentaires sont conséquemment requis afin d'éviter une maladie auto-immune. Ces mécanismes sont regroupés sous l'appellation de la tolérance immunitaire périphérique. Celle-ci consiste en la patrouille des organes périphériques par des cellules immunitaires dites tolérogènes, principalement, les lymphocytes T régulateurs (Treg) (Parham, 2009). Ces dernières sont désignées comme étant des lymphocytes T exprimant les marqueurs $CD4^+$, $CD25^+$ et $FOXP3^+$ et sont soit des Tregs naturels (nTreg) ou induite (iTreg). Ils sont une sous-population de lymphocytes T constituant 5 à 10% de la population lymphocytaire totale (Elkord, 2009). Les lymphocytes T régulateurs sont connus pour induire l'anergie des lymphocytes T autoréactifs par des mécanismes de contacts cellulaires impliquant des récepteurs membranaires tels que les récepteurs CD39, CD73, CTLA-4, LAG-3, et le complexe d'attaque cellulaire perforine/granzyme. De plus, les lymphocytes T régulateurs vont aussi sécréter des cytokines d'immunorégulation dont l'IL-10, le TGF- β , l'IL-35 et la galectine-1 (Wing et Sakaguchi, 2010). Les lymphocytes T régulateurs peuvent aussi empêcher la prolifération des lymphocytes T autoréactifs en consommant la cytokine pro-inflammatoire IL-2 (Wing et Sakaguchi, 2010). Finalement, les lymphocytes T régulateurs sont aussi en mesure d'interagir indirectement sur les lymphocytes T autoréactifs par le biais de l'induction des fonctions tolérogènes des cellules dendritiques et la déletion de DCs présentant des antigènes du soi (Waisman, 2016).

Néanmoins, depuis les 20 dernières années, deux autres types cellulaires immunitaires ont été décrits comme étant des participants importants pour

l'élaboration de la tolérance immunitaire périphérique: les cellules dendritiques et les ILC3 (innate lymphoid cells). L'essence de ces cellules ainsi que leur participation à la tolérance périphérique sera élaborée plus loin dans le texte.

Physiologie et rôle des principaux organes touchés par la maladie de Crohn: l'intestin grêle et le côlon

Le tractus intestinal a comme tâche principale d'assimiler le plus possible de nutriments ingérés, et ce, de façon sécuritaire. Ceci requiert donc une incroyable coordination du système immunitaire et des cellules somatiques. Les deux sites majeurs d'absorption du tractus intestinal sont l'intestin grêle (à noter qu'à partir d'ici, l'intestin grêle sera mentionné comme étant simplement «l'intestin») et le côlon. Bien que directement inter-reliés, ces deux organes sont dissociables du point de vue structurel et fonctionnel.

L'intestin est un organe tubulaire se divisant en trois parties : le duodénum, le jéjunum ainsi que l'iléum. De plus, l'intestin est composé de quatre couches tissulaires (tel qu'énuméré ici en commençant par le tissu le plus près de la lumière intestinale : le lumen): la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (**Figure 2**).

La muqueuse est délimitée par un épithélium dont les types cellulaires sont abordés plus loin en détail. En dessous de la muqueuse, se trouve la *lamina propria* qui est composée d'un tissu conjonctif lâche et très vascularisé où sont localisés un grand nombre de cellules immunitaires. La muqueuse est conscrite par une couche de cellules musculaires lisses appelée la *muscularis mucosae* (Brown *et al.*, 2013).

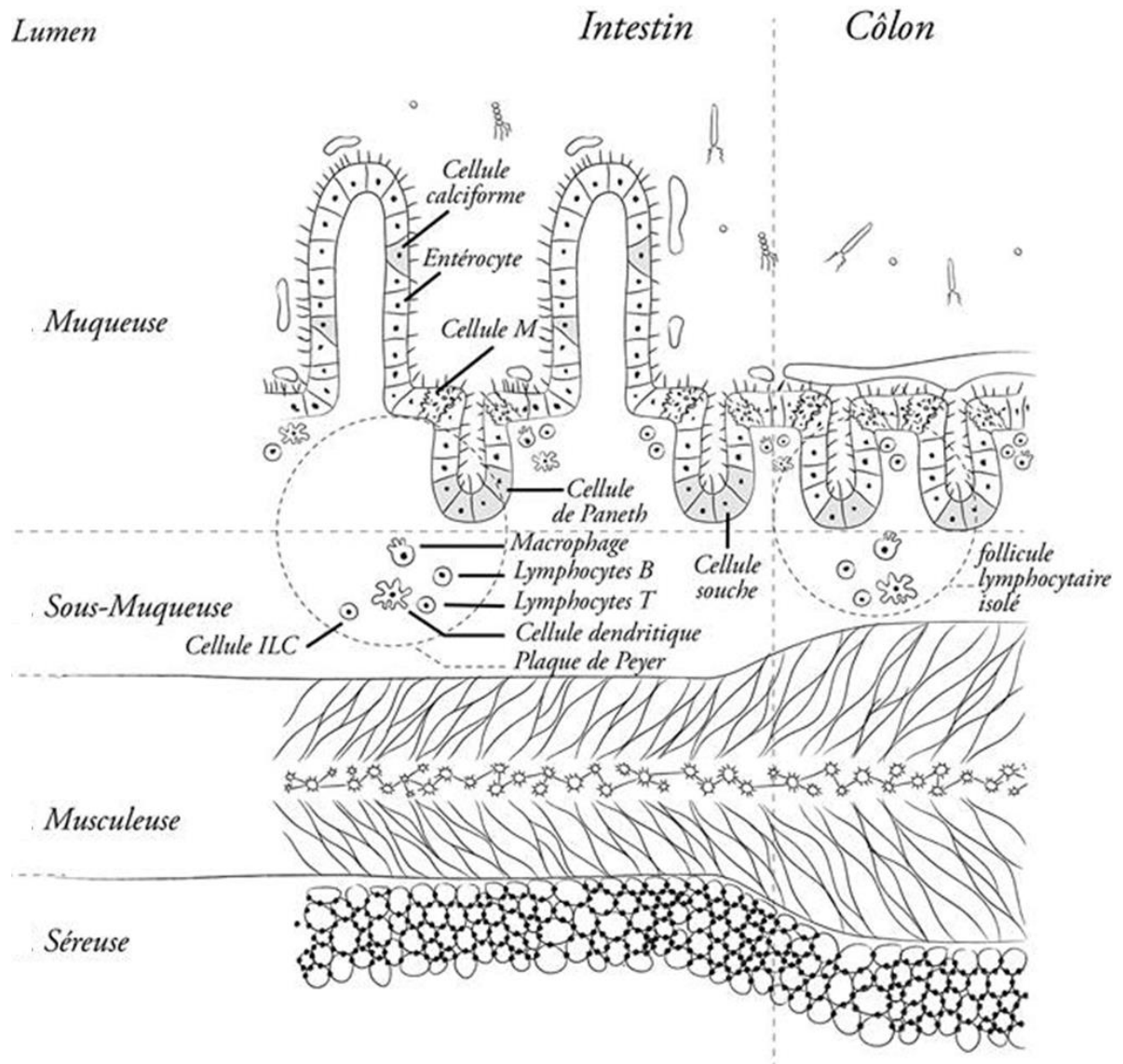


Figure 2 : Schéma de la structure intestinale et colonique.

L'intestin et le côlon ont plusieurs similitudes physiologiques. Premièrement, tous deux se divisent entre quatre organisations tissulaires soit la muqueuse, la sous-muqueuse et la séreuse. Dans ce mémoire, nous focaliserons principalement sur la muqueuse et la sous-muqueuse, où se concentre la majorité des interactions immunitaires. Deuxièmement, les deux organes se composent des mêmes types cellulaires, aux exceptions près que les entérocytes sont appelés colonoctes au niveau du côlon, que les cellules de Paneth sont absentes au niveau du côlon et que les organes lymphoïdes tertiaires de l'intestin et du côlon sont respectivement nommés les plaques de Peyer et les follicules lymphocytaires isolés. Dessin de Samuel Paul sous la direction de l'auteur.

La sous-muqueuse, composée d'un tissu conjonctif plus dense, contient le système nerveux sympathique qui orchestre la motilité du tube digestif. C'est aussi dans la sous-muqueuse que l'on trouve les plaques de Peyer dans l'intestin et leur pendant immunitaire dans le côlon, les follicules lymphoïdes isolés (Marieb et Hoehn, 2010).

La musculature est agencée en deux axes de cellules musculaires lisses, circulaires et longitudinales, afin de façonner des cerceaux internes musculaires et une couche filamenteuse externe. Ainsi assemblées, ces deux couches musculaires permettent les mouvements intestinaux nécessaires à la motion et conséquemment du contenu intestinal, mouvements végétatifs appelés péristaltisme. Localisés entre ces deux couches musculaires, des plexus nerveux dirigent l'innervation végétative associée au péristaltisme (Tortora et Derrickson, 2009).

La séreuse est une couche de tissu conjonctif dense vascularisée et comportant de nombreux adipocytes. Cette couche se termine par un mésothélium, qui est le feuillet viscéral du péritoine (Tortora et Derrickson, 2009).

Structuralement, la muqueuse de l'intestin est assemblée en villosités, soit 3000 villosités/cm², composés de cellules épithéliales qui eux-mêmes possèdent des microvillosités, donnant ainsi à la muqueuse intestinale une apparence de brosse. Tandis que les villosités sont un arrangement tissulaire, les microvillosités sont des prolongements de membranes cytoplasmiques de l'épithélium servant à augmenter la surface de contact. Cette spécialisation architecturale donne à l'intestin une aire d'absorption potentielle de 300m² pour ses courts 6 mètres de longueur (Campbell et Reece, 2007).

La couche épithéliale de la muqueuse est composée de cinq types cellulaires : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules souches intestinales, les cellules

de Paneth ainsi que les cellules M. Les entérocytes intestinaux sont les cellules responsables de la majorité de l'absorption sélective des nutriments. D'autre part, les cellules caliciformes sécrètent une épaisse couche de mucus de 150 μM composée de mucines et de glycoprotéines réparties en une double couche de mucus protecteur. La couche de mucus interne est exempte de bactéries tandis que la couche de mucus externe abrite un nombre restreint de bactéries. Ce mucus a pour rôle d'être une barrière physique entre le contenu intestinal et la couche épithéliale, et d'être aussi une source de nutriments pour les bactéries commensales (Brown *et al.*, 2013). Malgré tout, la barrière épithéliale doit être fréquemment renouvelée, à partir des cellules souches intestinales situées à la base des villosités. Pour leur part, les cellules de Paneth sécrètent de façon spontanée différents peptides antimicrobiens, assurant ainsi une défense immunitaire de base (Clevers et Bevins, 2013). Pour une défense immunitaire affinée, les cellules M permettent le transport d'antigène par transcytose du lumen vers des organes lymphoïdes tertiaires spécialisés situés dans la *lamina propria* de l'intestin et les plaques de Peyer (Mabbot *et al.*, 2013). Celles-ci sont composées de différents types cellulaires immunitaires, dont les DCs, les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes B et T et les ILC. Il est à noter que la majorité de l'activité immunitaire intestinale se déroule dans la *lamina propria*, dans les plaques de Peyer, mais aussi au niveau de la couche épithéliale

Le gros intestin possède de fortes ressemblances avec l'intestin grêle. C'est un organe tubulaire se divisant en quatre parties : le caecum, le côlon, le rectum et le canal anal. Le côlon est là où la majorité des nutriments et vitamines laissée par l'intestin sont absorbés. Le côlon est aussi composé de quatre couches tissulaires similaires à celles précédemment mentionnées pour l'intestin (Tortora et Derrickson, 2009).

Structuralement, le côlon est différent de l'intestin. En effet, au lieu de villosité, le côlon a une structure en cryptes qui s'insèrent dans la muqueuse. Néanmoins, les cellules composant la barrière épithéliale du côlon sont les mêmes que celles

composant la barrière épithéliale intestinale à l'exception de l'absence de cellules de Paneth. De plus, dans le côlon, les tissus lymphoïdes tertiaires localisés dans la *lamina propria* sont différents et portent conséquemment un autre nom : les follicules lymphocytaires isolés (Constantinovits *et al.*, 2012). Selon les données récentes de la littérature, il n'existe pas de différences entre les populations immunitaires intestinales et coloniques.

Ainsi, l'intestin et le côlon sont deux organes différents orientés vers les fonctions qui leur sont propres. L'architecture de ces organes implique entre autres un contact constant avec des bactéries, virus, protozoaires et champignons.

Microbiome du tractus intestinal

Le microbiome, soit l'ensemble des organismes bactériens; viral; protozoaires; parasites ou fongiques composant la flore intestinale, contribue jusqu'à 1.5kg de la masse corporelle (Pluznick, 2014). Il y a environ 10^{13} bactéries dans le tractus intestinal avec 10^5 - 10^6 bactéries dans l'intestin et 10^{11} - 10^{12} bactéries dans côlon (Marietta *et al.*, 2015) surpassant ainsi de 100 fois le nombre de cellules somatiques humaines (Pluznick, 2014). Fait intéressant, le microbiome est essentiel à la fonction intestinale et colonique. En effet, le microbiome participe à la défense immunitaire (Grasa *et al.*, 2015), à l'absorption des nutriments (O'Connor, 2013), et contribue aussi à l'homéostasie de plusieurs organes distants comme le foie (Henao-Mejia *et al.*, 2012), le pancréas (Sun *et al.*, 2015), le cœur (Rune *et al.*, 2016) et le cerveau (Perry *et al.*, 2016).

L'acquisition du microbiome est un procédé important dans le développement général du système immunitaire. Effectivement, plusieurs études suggèrent qu'une acquisition inadéquate du microbiome corrèle avec la susceptibilité à développer des pathologies auto-immunes (Candon *et al.*, 2015) ou des pathologies allergiques (Melli *et al.*, 2015).

C'est lors des trois premières années de vie que l'acquisition d'un microbiome stable est critique (Mejia-Leon et Calderón de la Barca, 2015). Pendant cette période, il existe vraisemblablement une sélection des bactéries commensales, mais les mécanismes associés sont, pour l'instant, des plus abscons. Il est suggéré que l'acquisition du microbiome se déroule en deux étapes : 1) avant la naissance et 2) pendant les trois premières années de vie. Le premier contact avec le microbiome est théoriquement possible dans le milieu utérin. En effet, le placenta est un environnement non-stérile (Aagaard *et al.*, 2014) alors que les lymphocytes B et T sont fonctionnels à partir de la 16^e semaine de gestation, suggérant que le système immunitaire pourrait être acclimaté lors de la gestation. De plus, la prise d'antibiotiques par la mère avant la naissance est un centre d'intérêt croissant quant à l'avènement de maladies auto-immunes et allergiques (Mejia-Leon et Calderón de la Barca, 2015).

Ainsi, la première rencontre officieuse avec le microbiome se fait lors de l'accouchement et varie donc fortement avec le type de mise bas. De nouvelles évidences ont récemment surgi démontrant qu'il découlerait de l'accouchement par césarienne un nombre important de pathologies dû à l'altération du microbiome de départ (Dominguez-Bello *et al.*, 2016, Khashan *et al.*, 2016). Par exemple, les enfants nés par un accouchement vaginal développent un microbiome principalement composé de bactéries de type *Lactobacillus*, *Prevotella* et *Sneathia* tandis que les enfants qui sont nés par césarienne ont un microbiome principalement composé de bactéries *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionbacterium* (Mejia-Leon et Calderón de la Barca, 2015). Bref, le type d'accouchement introduit des microbiomes alternatifs, pouvant moduler l'éducation du système immunitaire.

L'éducation post-partum du microbiome est par la suite influencée par le régime alimentaire. Par exemple, l'utilisation de lait de vache potentialise les susceptibilités de l'individu aux maladies auto-immunes (Nielsen *et al.*, 2014).

Effectivement, alors que l'allaitement diminue les risques du diabète de type 1, l'utilisation du lait de vache l'augmente chez les individus à risque (Emani *et al.*, 2013 ; Driver *et al.*, 2011). Cette augmentation est annulée lors de l'utilisation de lait hydrolysé, ce qui pourrait être dû à un changement du microbiome (Nielsen *et al.*, 2014). Effectivement, les enfants nourris par formulation en poudre contribuent à l'acquisition d'un microbiome potentiellement pathogène tel que *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* et *Bacteroides* alors que l'allaitement favorise le développement de bactéries utilisant le lactose (Mejia-Leon et Calderón de la Barca, 2015, Guaraldi et Salvatori, 2012, a Dominguez-Bello *et al.*, 2011). Ces études suggèrent que la diète pourrait être une des causes de l'induction de maladies auto-immunes.

D'autre part, la présence de populations microbiennes constantes essentielles à l'hôte et leur caractérisation est l'une des préoccupations des travaux scientifiques à travers le monde. Il est généralement accepté que le microbiome humain se compose majoritairement de deux phyla, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, ainsi qu'une présence significative, mais minoritaire, des *Actinobacteria*, des *Proteobacteria*, des *Verrucomicrobia* et des *Fusobacteria* (Eckburg *et al.* 2005 ; Tremaroli et Backhed, 2012). Bien qu'un quorum bactérien humain ou murin n'ait pas encore été déterminé dû à la variabilité interpersonnelle associé à la santé générale, l'âge, la localisation géographique et la diète (Guinane et Cotter, 2013), il est accepté que la maladie de Crohn affecte grandement les populations bactériennes des sujets touchés. On note, entre autres, une perte générale de la diversité bactérienne, ainsi qu'une diminution d'abondance de *F. prausnitzii* chez les patients qui ont cette maladie (Hedin *et al.*, 2016)

Les interactions entre le corps et le microbiome sont encore nébuleuses. Néanmoins, plusieurs études montrent que le corps est en mesure d'influencer le microbiome (Mortha *et al.*, 2014) et vice versa (Braniste *et al.*, 2014). Il existe de nombreux cas de dysbioses associé à l'avènement d'une maladie qui de prime abord ne semble pas associé au microbiome dont notamment l'encéphalite

expérimentale autoimmune (Stanisavljević *et al.*, 2016), le diabète de type 1 (Lin et Zhan, 2017) et l'arthrite rhumatoïde (Ciccia *et al.*, 2016). Il est encore prématuré pour évaluer ce qui vient en premier : la maladie ou la dysbiose. Néanmoins, dans le contexte de la maladie de Crohn, il a été montré que le transfert du microbiome d'une souris malade à une souris saine peut engendrer la maladie de Crohn (Schaubeck *et al.*, 2015).

En conclusion, le microbiome est un acteur majeur dans la maladie de Crohn, et ce malgré le fait qu'il soit encore méconnu. Néanmoins, il est fort probable que le rôle du microbiome soit une cause des altérations du système immunitaire perçu dans la maladie de Crohn.

Consensus de la pathogénèse de la maladie de Crohn

Bien que l'étiologie de la maladie de Crohn soit inconnue, il est probable que le système immunitaire soit activé suite à une perte de tolérance de la part de l'hôte envers les antigènes luminaux. Ainsi, pour une raison inconnue, il y aurait un contact anormal entre l'hôte et des antigènes du microbiome induisant l'état pathologique. Il y aurait activation des cellules présentatrices d'antigènes sentinelles (APC), par exemple les DCs, suivie d'activation de celles-ci et ainsi en résulte une augmentation de leur potentiel de présentation antigénique par l'expression de molécules de costimulation et la production de cytokines proinflammatoires dont notamment l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-23 (Maloy et Powrie, 2011). Ainsi, dans la pathophysiologie de la maladie de Crohn, les DCs ou les macrophages induiraient une inflammation de la zone du tractus intestinal touchée par le recrutement des lymphocytes T aux cryptes induisant la formation d'abcès par le recrutement conjoint des neutrophiles et des macrophages. De la persistance de ce phénomène découle la progression de l'inflammation vers la formation de petits ulcères qui vont se rejoindre et créer l'aspect fissuré caractéristique du tissu malsain (Kaistha et Levine, 2014). De façon surprenante, la réponse immunitaire engendrée dans la maladie de Crohn est de type T_{H1} et

T_{H17} . En effet, le fait que la réponse immunitaire ne soit pas aussi accompagnée de réponse T_{H2} est un mystère, étant donné la nature diversifiée du microbiome, puisque le tractus intestinal recèle de plus de 10^4 types d'individus microbiens, la réponse immunitaire devrait couvrir aussi la réponse T_{H2} . Nonobstant, le profil de cytokines de la maladie de Crohn est caractérisé par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-18, IL-27, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17, IL-21 et IL-23, des cytokines anti-inflammatoires IL-10, IL-22 et des cytokines pouvant induire une fibrose, l'IL-13 et le TGF- β . Les différentes pistes de recherches récentes qui tentent d'apporter des pistes de réponses pour l'élaboration d'un traitement pour la maladie de Crohn seront élaborées dans la section suivante.

Piste de recherches actuelles pour l'élaboration de traitement pour la maladie de Crohn

La question fondamentale de ce domaine scientifique est de découvrir l'étiologie de la maladie de Crohn. En effet, sans cette information, il est excessivement difficile d'élaborer un traitement curatif. À partir des connaissances actuelles, il est possible d'énumérer six facteurs qui pourraient être la cause ou/et le facteur contribuant au développement de cette pathologie : la diète, le stress et les problèmes psychologiques, l'altération de la physiologie intestinale et des fonctions immunitaires de l'hôte ainsi que l'altération du microbiome.

Une diète inadéquate est l'un des principaux suspects comme événement déclencheur de la maladie de Crohn. Cet énoncé est entre autres conforté par le fait que les patients atteints de la maladie de Crohn ont de fortes convictions sur le rôle de l'alimentation dans la gestion de leurs symptômes. De plus, en Europe, les diètes à restriction alimentaires sont considérées comme étant la première ligne de traitement des maladies inflammatoires de l'intestin, dont la maladie de Crohn (Hou *et al.*, 2014). En premier lieu, la diète a une grande part de responsabilité dans la modification du microbiome. Tandis que la génétique explique 12% de la

variation du microbiome, la diète en explique 57% (Moreno-Indias *et al.*, 2014). Il fut précédemment démontré qu'une diète riche en gras et/ou en gluten augmente le nombre de *Bacteroides* (Davis-Richardson et Triplett., 2015). Pour sa part, la diète riche en fibre transmet ses effets par la production de SCFA (acide gras à chaîne courte ou encore <<Short chain fatty acid>>) (Ce mécanisme sera élaboré plus loin dans ce texte). Ainsi, la diète a un mécanisme d'action plausible de modulation du microbiome. Plusieurs études ont émis l'hypothèse que la maladie de Crohn est une conséquence d'une alimentation déviante des besoins alimentaires humains. Ces études mentionnent, entre autres, l'implication des oligo di/mono- saccharides ou polyols faiblement absorbés (FODMAP), des fibres insolubles, des acides gras à chaînes courtes, de la fumée de cigarette et des émulsifiants (tel que le polysorbate 80 et la carboxycellulose).

Les FODMAP sont des sucres très faiblement métabolisés par le corps humain, mais très facilement métabolisés par les bactéries des intestins. Les FODMAP sont retrouvés en grande quantité dans les pâtes et les produits de restauration rapide (Hou *et al.*, 2014). Par leur fermentation rapide, ceux-ci induisent une croissance rapide des bactéries et une surcharge bactérienne associée. Selon les partisans de la diète anti-FODMAP, la dilatation des intestins engendrée par la fermentation ainsi que la surcharge bactérienne augmentent la perméabilité de l'intestin, ce qui est une marque distinctive de la maladie de Crohn (Schwender *et al.*, 2014). Il a été reporté aussi que la diète anti-FODMAP fonctionne très bien pour augmenter le ratio de temps pendant lequel les patients atteints de la maladie de Crohn sont en santé par rapport à la durée des périodes de maladie. De plus, la diète anti-FODMAP permet de diminuer l'intensité des symptômes des patients atteints de la maladie de Crohn (Gibson et Shepherd, 2005). D'autre part, une partie des effets néfastes des FODMAP pourrait être expliquée par le fait que les <<Short chain fatty acid>> sont des métabolites directs des FODMAP (Hou *et al.*, 2014).

Les SCFA sont dérivés de l'ingestion de fibres insolubles. Les fibres insolubles sont définies comme étant des sucres complexes non-digérés par l'organisme qui sont pris en charge par les bactéries anaérobiques du côlon et dérivés en métabolites appelés SCFA. Les SCFA constituent donc un ensemble de plusieurs métabolites, mais leur étude est fréquemment réduite aux trois principaux SCFA retrouvés dans le tractus intestinal humain : l'acétate, le propionate et le butyrate (Puddu *et al.*, 2014). Les SCFA ont démontré des effets modulateurs forts intéressants du système immunitaire comme la diminution de la sévérité des symptômes de l'asthme, l'augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs (Thorburn *et al.*, 2015), la diminution de la perméabilité de la barrière épithéliale en augmentant les protéines des jonctions cellulaires et en augmentant la quantité de mucus intestinal (Davis-Richardson et Triplett., 2015). Les SCFA peuvent aussi causer un changement de la composition du microbiome par leurs propriétés acidifiantes (Bordalo Tonucci *et al.*, 2015).

La fumée de cigarette semblerait être aussi un facteur de cause environnemental de la maladie de Crohn. En effet, une méta-analyse de la littérature à ce sujet recense que les fumeurs, comparativement aux non-fumeurs, ont une augmentation des risques d'épisodes de la maladie avant et après une chirurgie intestinale. De plus, le nombre de chirurgie pour la maladie de Crohn est en moyenne plus élevé chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Qui plus est, ces deux paramètres reviennent à la normale lorsqu'un fumeur arrête sa consommation de cigarettes. (To *et al.*, 2015).

D'autre part, les émulsifiants sont un nouveau suspect comme facteur de cause de la maladie de Crohn. En effet, une récente étude parue dans la revue Nature a démontré l'utilisation des émulsifiants comme des pratiques alimentaires alarmantes de la part du milieu agroalimentaire. Il a été rapporté dans cette étude que des émulsifiants, soit le polysorbate-80 et le carboxyméthylcellulose, augmentent la perméabilité intestinale et une dysbiose du microbiome, induisant ainsi une inflammation subclinique et le syndrome métabolique. Fait inquiétant, les

concentrations des émulsifiants utilisés dans cette étude reflètent les concentrations présentement appliquées dans le milieu agro-alimentaire (Chassaing *et al.*, 2015).

Ainsi, le retrait des aliments comprenant du polysorbate-80 ou du carboxyméthylcellulose permet de réduire l'intensité des symptômes associés à la maladie de Crohn de façon variable d'un patient à un autre. Ces composés présentent deux caractéristiques fonctionnelles intéressantes : ils altèrent la population bactérienne de l'intestin et induisent l'irritation intestinale. Ceci a mené à un concept révolutionnaire : « nous sommes ce que nous mangeons ». Ainsi, ces données corroborent le fait que le contenu intestinal bactérien, le microbiome, pourrait avoir rôle majeur dans la maladie de Crohn.

Le mode de vie occidental est aussi considéré comme un facteur de cause potentiel de la maladie de Crohn. Plusieurs études ont relié les problèmes psychologiques aux maladies inflammatoires de l'intestin, dont la maladie de Crohn (Hayes *et al.*, 2014). Le lien entre le système nerveux et le tractus intestinal (et vice versa) est connu depuis des décennies. Cependant, dans ce domaine d'étude de la maladie de Crohn, la majeure question est : est-ce que les problèmes psychologiques rencontrés sont une cause ou une conséquence de la maladie de Crohn? Encore aujourd'hui, cette question reste en suspens. Une découverte récente rapporte que le microbiome a un impact sur le système nerveux central (Braniste *et al.*, 2014). Ainsi, non seulement le cerveau et l'intestin sont liés, mais aussi le cerveau et les bactéries contenues dans l'intestin. Serait-ce possible que le système nerveux influence de façon directe la sélection des bactéries lumineales ou encore existe-t-il un lien entre le système nerveux entérique et le microbiome? Présentement, ce champ d'étude est encore complètement méconnu.

L'attention portée au microbiome s'est récemment décuplée dû à son impact aussi bénéfique que néfaste sur les autres systèmes du corps humain. Étant donné la variabilité de sa composition, les recherches actuelles tentent de comprendre

comment le microbiome est acquis et sa présence soutenue par le corps. En effet, comment l'harmonie est-elle possible entre le système immunitaire et le microbiome? Comment le corps peut-il détecter que telle bactérie est une commensale et que telle bactérie est un pathogène parmi la pléthore de potentiels envahisseurs? Comment le corps fait-il ensuite pour éliminer spécifiquement ce pathogène? Que sont les mécanismes associés? Tant de questions et si peu de réponses. C'est pour cela que ce champ de recherche est aussi effervescent. Malgré la nouveauté du sujet, il est clair que le microbiome est au cœur de la maladie de Crohn. Plusieurs études ont relevé des changements des populations bactériennes parmi les patients atteints de la maladie de Crohn. De plus, l'introduction d'une nouvelle flore intestinale, la transplantation fécale, a su réduire grandement les symptômes de la maladie de Crohn chez certains patients (Cui *et al.*, 2014). Cependant, cette thérapie n'est valide que pour une petite proportion de cas et peut avoir des effets secondaires qui sont pour l'instant inconnus. Par exemple, Alang et collaborateur ont publié le rapport de cas d'un transfert fécal qui a induit l'obésité (Alang et Kelly, 2014). Ainsi l'étude du microbiome a un énorme potentiel non seulement pour le traitement de la maladie de Crohn, mais aussi pour un tout nouveau répertoire de connaissances permettant d'influencer le cours d'autres maladies.

Enfin, la dernière hypothèse de recherche focalise sur le système immunitaire de l'hôte. En effet, plusieurs dysfonctions du système immunitaire ont été associées à la maladie de Crohn. Contrairement aux autres pistes de recherche, l'étude du système immunitaire intestinal est très bien documentée et outillée pour trouver un traitement panacée à cette pathologie.

En premier lieu, plusieurs polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs) sont associés au système immunitaire et ont été corrélés avec la maladie de Crohn. La majorité des SNPs découverts sont associés à la reconnaissance bactérienne et aux immunodéficiences primaires et signalisation immunitaires comme par exemple des SNPs dans les gènes codant pour CARD9, CARD11, NOD2, TAP1/2

et CD40, TYK2, STAT1, STAT3, STAT5B, JAK2, SOCS1, IFNGR2m, IL-10, IL12B, IL23R, PTPN22 (Jostin *et al.*, 2012). Fait intéressant, ces SNPs sont localisés dans les loci qui sont dans les régions de susceptibilité au diabète de type 1 et aux infections bactériennes, suggérant une causalité logique entre la maladie de Crohn, le diabète de type 1 et les infections bactériennes (Jostin *et al.*, 2012). Fait encore plus intéressant, même si les corrélations sont observées au niveau de différentes cellules immunitaires, le plus grand nombre de corrélations et la plus grande force de corrélation sont associés aux niveau des cellules dendritiques (Jostin *et al.*, 2012), suggérant un rôle important pour ces cellules dans la maladie de Crohn.

En majorité, les travaux de recherche sur le système immunitaire se focalisent sur la modulation de l'inflammation côlonique animale comme la colite induite par du DSS (Perse et Cerar, 2012), par des infections bactériennes (Sato-Takayama *et al.*, 2014) ou par des virus (Yin *et al.*, 2014). Les modèles d'inflammation intestinale ont permis d'élaborer l'hypothèse de l'antigénicité du microbiome qui stipule qu'en temps normal, au contact des nutriments et des antigènes provenant du lumen, la réponse immunitaire induite naturellement est une réponse immunitaire tolérogène. Cette réponse immunitaire tolérogène est connu sous le terme de la tolérance orale et est quantifiée par dosage d'anticorps dirigé contre l'antigène préalablement ingéré. Dans le cas de la maladie de Crohn, il est suggéré qu'un défaut dans la tolérance immunitaire orale est responsable d'une réaction excessive contre les bactéries commensales (Scott *et al.*, 2011). Fait particulier, dans le contexte intestinal, la tolérance aux commensales semble être restreinte aux muqueuses intestinales plutôt qu'à l'organisme entier. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la tolérance immunitaire orale dont notamment la délétion ou l'anergie clonale des lymphocytes T réactifs et l'induction des Tregs. Qui plus est, la nature du mécanisme utilisé semble varier selon la nature et la dose de l'antigène ingéré (Scott *et al.*, 2011). Ainsi, un antigène reflétant 25% des anticorps murins en colite a été identifié (Lodes *et al.*, 2004), soit l'antigène de flagelle bactérien CBir1. La présence de cet antigène a aussi été

confirmé chez les patients atteints de la maladie de Crohn et corrèle avec une hausse significative de cellules $\text{IFN}\gamma^+$ de la *lamina propria*. (Shen *et al.*, 2008). L'un des types cellulaires les plus impliqués dans l'induction de la tolérance immunitaire périphérique sont les cellules dendritiques. Dans le cadre de la maladie de Crohn, il a été précédemment démontré que le nombre et la fonction des DCs intestinaux sont altérés (Rutella et Locatelli, 2011).

Ainsi, parmi les pistes de recherche pour un traitement de la maladie de Crohn, l'étude du système immunitaire permet de progresser rapidement et pourrait mener vers l'aboutissement d'un traitement efficace. C'est pour cela qu'il y a un engouement grandissant du rôle des cellules dendritiques dans ce domaine.

Cellules dendritiques et maladie de Crohn

Les cellules dendritiques (DCs) intestinales sont les cellules sentinelles immunitaires par excellence qui représentent de 2 à 4 % des populations leucocytaires (Waisen *et al.*, 2016). Outre composés de plusieurs sous-populations hétérogènes par leur phénotype et leurs fonctions, les DCs peuvent être dans deux états fonctionnels : immatures et mature. Patrouillant les tissus périphériques sous leur forme immature, les DCs sont en mesure de capter un large nombre d'antigènes spécifiques à leur localisation. Dans l'intestin, les DCs se retrouvent dans tous les organes lymphoïdes associés à l'intestin en plus d'être présent dans la *lamina propria* de l'intestin et du côlon (Scott *et al.*, 2011). Les DCs sont les cellules immunitaires qui rencontrent en premier les antigènes du lumen étant donné leur étroite association avec les cellules épithéliales (Scott *et al.*, 2011). De plus, les DCs sondent la lumière intestinale par leurs projections cytoplasmiques (Yin *et al.*, 2014). Suite à une stimulation cytokinique, les DCs sont en mesure de passer de leur état immature vers leur état mature, ce qui est accompagné d'un changement cellulaire drastique augmentant leur potentiel de présentation antigénique spécifique en augmentant leur expression de CMH, de molécules de

costimulation, de production de cytokines proinflammatoires, de leurs intégrines CCR7 spécifiques aux organes lymphoïdes secondaires et en réduisant leur capacité d'endocytose (Sato et Fujita, 2007). Afin d'accomplir leurs fonctions immunogènes ou tolérogènes, les DCs doivent migrer jusqu'aux ganglions drainants. Bien que cette migration soit constitutivement continue, celle-ci peut être accentuée par la présence de molécules pro-inflammatoires (Worbs *et al.*, 2016). Ainsi, la capacité des DCs à initier et à coordonner le système immunitaire adaptatif est une conséquence de leur localisation spécialisée. La fonction immunitaire des DCs obtenue suite à leur maturation est dépendante de l'environnement cytokinique dans lequel ils sont activés. Les DCs sont ainsi en mesure de promouvoir une réponse immunitaire adaptative de type T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} , voire tolérogènes (Jing Sim *et al.*, 2015). Cellules spécialisées de la présentation antigénique, les DCs intestinaux transportent des commensaux vivants jusqu'aux ganglions lymphatiques afin de stimuler la production d'IgA, ce qui permet de réduire leur pathogénicité opportuniste. Les DCs restreignent les bactéries aux ganglions lymphatiques mésentériques afin d'éviter une réponse immunitaire systémique inappropriée (Worbs *et al.*, 2016). Les DCs tolérogènes sont cruciaux à l'homéostasie intestinale, mais la compréhension de l'acquisition de leurs compétences tolérogènes est encore incomplète. Il est néanmoins certain que l'environnement mucosal riche en TSLP, TGF- β , IL-10, PGE-2 et en acide rétinoïque favorise ces fonctions. De plus, certaines souches bactériennes stimulent le conditionnement des DCs. Par exemple, plusieurs souches de commensaux spécifiques du genre des *Bactéroides*, des *Bifidobactérie* et des bactéries filamenteuses segmentées peuvent promouvoir le phénotype tolérogène chez les DCs (Scott *et al.*, 2011). Certains nutriments ont aussi la capacité de moduler les fonctions tolérogènes des DCs. Une déficience en vitamine A, entre autre, réduit la capacité des DCs à migrer aux ganglions et induire la différenciation des Treg (Scott *et al.*, 2011). Le tryptophane est nécessaire à l'axe tolérogène de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui inhibe la croissance des lymphocytes T et promeut l'induction de Treg. Il en est de même pour les ligands du récepteur aux aryl hydrocarbène (retrouvés dans les cruciformes dont le brocoli et le chou-fleur)

et les ligands du Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) (Scott *et al.*, 2011). Mention spéciale au curcuma, qui suite à son ingestion induit le caractère tolérogène des DCs (Scott *et al.*, 2011).

Dans le cas de la maladie de Crohn, l'inflammation intestinale est corrélée avec une infiltration de DCs dans la lamina propria et une baisse du nombre de DCs dans le sang périphérique (Rutella et Locatelli, 2011). De plus, les cellules épithéliales des patients atteints de la maladie de Crohn manifestent des niveaux fortement diminués de TGF- β , d'acide rétinoïque et de TSLP dérégulant l'homéostasie des DCs (Rescigno, 2014). À la lumière de ces anomalies, différentes approches ont été proposées afin de restaurer et augmenter le potentiel tolérogène des DCs dont l'utilisation de facteurs de croissance, l'utilisation de probiotiques et la prise en main de la diète (Rutella et Locatelli, 2011).

Dans les intestins, les quatre sous-populations majeures de DCs sont caractérisés par leur expression constitutive élevée de CD11c et de CMH-II, et par leur expression différentielle de l'intégrine CD103 et de CD11b (Persson *et al.*, 2013). Alors que les DCs CD103⁺ sont considérés comme étant des résidents permanents des muqueuses du tractus intestinal, les DCs CD103⁻ proviennent du flux sanguin et sont dites <<de passage>> (Scott *et al.*, 2011). Le rôle des différentes sous-populations de DCs n'est pas complètement compris. Des quatre principales sous-populations, les DCs CD103⁺CD11b⁻ possèdent la plus grande capacité à induire les Tregs, alors que les CD11b⁺ sont plutôt inefficaces (Worbs *et al.*, 2016). En effet, bien que l'inactivation sélective des DCs CD103⁺CD11b⁻ réduise la génération de la population des Tregs en général, la tolérance orale reste intacte (Worbs *et al.*, 2016).

Dû à leur rôle pivot pouvant aussi bien soutenir que de réduire l'inflammation intestinale comme dans la maladie de Crohn, la modulation des cellules dendritiques est un sujet de recherche émergeant. En effet, de larges efforts scientifiques sont déployés afin de déterminer les facteurs pouvant favoriser l'état

tolérogène des DCs afin de développer une thérapie pouvant prévenir, réduire, voire guérir la maladie de Crohn. Alors que leur rôle proinflammatoire est bien défini, les DCs tolérogènes et leur rôle tolérogène sont encore mal caractérisés. Les DCs tolérogènes, souvent référés comme étant des DCs semi-matures, sont entre autres caractérisés par une expression diminuée de CMH-II et de molécules costimulation (CD80 et CD86) et une expression augmentée des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-27 et TGF- β) (Jing Sim *et al.*, 2015). Malgré l'avancement des connaissances, la ou les sous-populations de DCs tolérogènes ne sont pas encore complètement caractérisées.

Hypothétiquement, dans l'intestin les DCs tolérogènes doivent avoir un rôle capital dans la tolérance au microbiome bien qu'il n'ait pas encore été clairement prouvé que les DCs sont en mesure d'induire la tolérance envers le microbiome. Précédemment, il a été démontré que les DCs tolérogènes, présentant de faibles doses des antigènes du soi, sont en mesure d'induire l'anergie des lymphocytes T ou la génération de lymphocytes T régulateurs (Morel et Turner, 2011). De façon intéressante, les cellules épithéliales de l'intestin, par leur sécrétion de TSLP, d'acide rétinoïque, de TGF- β et d'IL-25 sont en mesure d'induire les fonctions tolérogènes des DCs environnants en faisant diminuer leur sécrétion d'IL-12, d'IL-23 et augmentant leur sécrétion d'IL-10 (Liu et Cao, 2015). Ainsi, étant donné l'importance capitale de l'environnement cytokinique dans lequel mature les DCs, un défaut dans l'orchestration cytokinique risque d'engendrer facilement une réponse immunitaire inappropriée. Une cytokine fondamentale dans l'éducation des DCs est le GM-CSF et est, en condition d'homéostasie, majoritairement sécrétée par les ILC3.

Les innate lymphoid cells : un nouveau regard sur la maladie de Crohn

En 2007, un nouveau type cellulaire immunitaire a été découvert : les Innate lymphoid cells (ILC). Ces cellules du système immunitaire inné se distinguent des

autres cellules immunitaires par leur localisation spécifique au niveau des muqueuses. On les retrouve donc en forte densité dans la peau, dans les poumons et le tractus intestinal (Robinette *et al.*, 2015). Ce type cellulaire n'a été découvert que récemment étant donné leur localisation spécifique, mais aussi leur nombre faible, et le fait que les ILC représentent moins de 1% des cellules composant le système immunitaire. Le nom des ILC vient du fait qu'ils semblent être le pendant inné des lymphocytes T_{H1} , T_{H2} , lymphocyte T régulateurs et T_{H17} .

Les ILC se divisent en trois familles : les ILC1, les ILC2 et les ILC3. Les ILC1 sont la famille des ILC les moins bien caractérisés et classés dans la même famille que les cellules NK étant donné leur forte production de $IFN\gamma$. Dû à cette production d' $IFN\gamma$, les ILC1 sont souvent associés à une réponse « T_{H1} -like». Il n'est pas encore clair si les ILC1 sont un sous-type cellulaire distinct ou plutôt une forme activée des ILC3 (Sonnenberg et Artis, 2015).

Les ILC2 sont présentement la famille des ILC la plus étudiée, étant donné leur rôle majeur dans l'asthme allergique. Ils se caractérisent entre autres par leur expression du facteur de transcription GATA3 et leur forte production de cytokine de type T_{H2} dont l'IL-5, IL-9 et IL-13 (Walker *et al.*, 2013). Bien qu'il s'agisse d'un domaine moins étudié, les ILC2 sont aussi impliqués dans la réponse antiparasitaire intestinale (Neill *et al.*, 2010).

Les ILC3 se sous-divisent en trois membres : les lymphoid tissues inducers (LTI), les ILC3 NCR+ et les ILC3 NCR-. Ces deux derniers peuvent exprimer ou pas le récepteur NKp46. Les ILC3 se caractérisent par leur expression du marqueur T_{H17} RORyt (Artis et Spits, 2015). De plus, ce sont des cellules qui sécrètent de l' $IFN\gamma$ de l'IL-17, de l'IL-22 ainsi qu'une forte quantité de GM-CSF (Artis et Spits, 2015). Plusieurs rôles importants ont été attribués aux ILC3. Premièrement, la sous-population des lymphoid tissue inducers, est essentielle au développement embryonnaire, à la formation *de novo* et à la réparation des tissus lymphoïdes secondaires (Eberl, 2005 ; Scandella *et al.*, 2008 ; Lane *et al.*, 2009).

Deuxièmement, les ILC3 ont été signalés comme étant des modulateurs du microbiome. Par le biais des DCs, les ILC3 sont en mesure d'induire la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales en sécrétant de l'IL-22 (Gallo *et al.*, 2012). Troisièmement, il a été démontré que les ILC3 sont en mesure de causer l'apoptose des cellules T ayant une activité dirigée contre le microbiome. Cette dernière fonction des ILC3, détaillé par l'équipe de Sonnenberg, est expliquée par l'absence de molécules de costimulation sur les ILC3, et une présentation antigénique efficace par les CMH causant la délétion des cellules T réactives à l'antigène présenté. Ainsi, comme la sélection négative au niveau du thymus, les ILC3 sont en mesure d'établir la tolérance envers les antigènes du tractus intestinal en éliminant les lymphocytes T spécifiques à ces antigènes (Hepworth *et al.*, 2015). Finalement, la sécrétion du GM-CSF par ILC3, pourrait être un autre mécanisme qu'utiliseraient les ILC3 pour d'induire la tolérance envers les antigènes luminaux. En accord avec cette hypothèse, l'équipe de Dr Myrad, avait rapporté que la détection du microbiome par les macrophages, stimule leur sécrétion d'IL-1 β et induirait la sécrétion de GM-CSF par les ILC3 et ainsi contribuent à l'homéostasie immunitaire intestinale (Morthas *et al.*, 2014). Dans ces travaux, la contribution des DCs à l'homéostasie intestinale n'a pas été élucidée.

Régulation et fonctions du GM-CSF

Découvert en 1977, le GM-CSF est une cytokine monomérique glycosylée composée de quatre hélices alpha d'un total de 127 résidus (Broughton *et al.*, 2012). Cette cytokine est sécrétée par de multiples types cellulaires dont les lymphocytes T activés, les éosinophiles, les mastocytes, les basophiles, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules stromales de la moelle osseuse ainsi que les ILC3 (Bhattacharya *et al.*, 2015 ; Hamilton, 2008). Tandis que l'IL-1, le TNF- α , le LPS, l'activation des TLR, la prostaglandine PG2 ou l'IL-23 induisent sa sécrétion par les types cellulaires précédemment mentionnés, alors

que l'IL-12, l'IFN γ , l'IL-10, l'IL-4, les glucocorticoïdes ainsi que l'IL-27 et l'IL-21 répriment sa sécrétion (Shi *et al.*, 2006 ; McGeachy, 2011 ; Denson et Klein, 2016 ; Van Nieuwenhuijze *et al.*, 2013 ; Wan *et al.*, 2013). Malgré le nombre important de types de cellules sécrétrices, le GM-CSF n'agit que sur un faible nombre de cellules. En effet, le GM-CSF n'agit que sur les précurseurs de cellules granulocytaires, les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (Bhattacharya *et al.*, 2015). Le GM-CSF est ainsi en mesure d'induire à l'état d'homéostasie la myélopoïèse alors qu'en situation de stress, le GM-CSF induit une augmentation du nombre de cellules granulocytaires et favorise la modulation de leur phénotype (Bhattacharya *et al.*, 2015). Il est à noter qu'étant donné que les cellules lymphocytaires n'expriment pas le récepteur au GM-CSF, le GM-CSF n'a aucun effet direct sur ces dernières (Jubinsky *et al.*, 1995). Le GM-CSF est catégorisé comme étant de la famille de l'IL-3, l'IL-5 et du GM-CSF étant donné que leurs récepteurs utilisent une chaîne bêta qui leur est commune (Broughton *et al.*, 2012). Le récepteur du GM-CSF est un récepteur JAK-STAT, composé d'une chaîne alpha spécifique au GM-CSF et de la chaîne bêta transmembranaire permettant la signalisation. Il a une affinité jusqu'à 20 picomoles par litre pour son ligand. Cette affinité est aussi élevée, car le récepteur au GM-CSF se dodécamérise (Broughton *et al.*, 2012). Conséquemment, le nombre de récepteurs par cellule est restreint entre 20 et 200 récepteurs. De plus la quantité de GM-CSF sanguin est aussi limitée en condition d'homéostasie (de l'ordre de 20 à 100 picogrammes par millilitre) par la présence d'auto-anticorps anti-GM-CSF et de récepteur au GM-CSF soluble (Broughton *et al.*, 2012). Suite à l'activation de son récepteur, le GM-CSF va signaler par quatre voies, soit la voie de PI3K/AKT, la voie de STAT3/5b, la voie des MAP kinases ainsi que la voie de NF- κ B. Globalement, ces quatre voies engendrent des signaux de survie, d'activation et de prolifération (Van de Laar *et al.*, 2012).

Il est connu que le GM-CSF a la capacité de promouvoir un phénotype tolérogène chez les DCs. Il est entre autres reporté que des DCs générés à partir de moelle osseuse (BMDCs) en présence d'une faible dose de GM-CSF sont immatures et

ont des capacités tolérogènes *in vivo* et *in vitro* (Lutz *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que l'injection ou l'expression constitutive de GM-CSF chez la souris est en mesure de protéger contre l'apparition de maladies auto-immunes par la promotion d'un phénotype tolérogène chez les DCs (Krakowski *et al.*, 2002 ; Gangi *et al.*, 2005). Cet effet a été entre autres attribué à l'augmentation du nombre de lymphocyte T régulateurs (Gaudreau *et al.*, 2007) et l'expression de cytokines anti-inflammatoire, dont l'IL-10 et le TGF- β et l'élévation de molécules de corépression, dont PD-L1 (Gaudreau *et al.*, 2010).

Potentiel thérapeutique du GM-CSF

Étant donné que l'influence du GM-CSF se limite à l'activation du système immunitaire inné, plusieurs thérapies ont dérivé des connaissances précédemment énoncées. Ainsi, le GM-CSF est utilisé pour favoriser la granulopoïèse pendant la radiothérapie (Mehta *et al.*, 2015), comme adjuvant de vaccin contre le cancer (Dranoff *et al.*, 2002), mais aussi expérimentalement dans le traitement de plusieurs maladies auto-immunes. Étant donné que le GM-CSF promeut une activation généralisée du système immunitaire, il n'est pas surprenant que le GM-CSF ne convienne pas à tous les contextes de maladie auto-immune. Ainsi, l'utilisation clinique du GM-CSF exacerbe l'arthrite rhumatoïde et l'encéphalite auto-immune expérimentale. Cependant, il a été démontré que l'injection de GM-CSF être aussi bénéfique puisqu'il ralentit le développement du diabète de type 1 (Bhattacharya *et al.*, 2015) et aussi réduit les symptômes associés à la maladie de Crohn (Egea *et al.*, 2010). De plus, le mécanisme d'action du GM-CSF qui permet l'atténuation des symptômes de la maladie de Crohn est encore inconnue.

Jusqu'à tout récemment, il n'y avait pas, voir peu d'attention sur le rôle du GM-CSF dans le contexte de la maladie de Crohn. Chez la souris, la déficience en GM-CSF ne crée pas de maladie intestinale spontanée, mais induit cependant un phénotype d'inflammation spontané pulmonaire et une susceptibilité aux pathogènes

entériques (Han *et al.*, 2010). Dans le même ordre d'idée, cette susceptibilité inflammatoire amplifie la colite induite au DSS chez les souris déficientes en GM-CSF (Xu *et al.*, 2008). Qui plus est, cette susceptibilité inflammatoire peut être mimée la diminution intestinal-spécifique du nombre de cellules dendritiques (Hirata *et al.*, 2010). Au contraire, la susceptibilité inflammatoire associée à la colite au DSS peut être diminuée par l'injection de GM-CSF chez la souris Balb/c, ceci étant démontré la diminution du score des paramètres histologiques, cliniques ainsi qu'une diminution d'expression de cytokines pro-inflammatoires (Sainathan *et al.*, 2008). Enfin, chez l'humain, le GM-CSF est détecté en plus grande quantité dans les zones lésionnelles des patients de la maladie de Crohn par rapport aux biopsies de patients sains (Panja *et al.*, 1998).

Suite à ces découvertes, plusieurs équipes intéressées à l'application thérapeutique potentielle du GM-CSF. En 2002, Dieckgraefe et Korzenik furent les premiers à tester le potentiel du GM-CSF chez des patients atteints d'une maladie de Crohn de sévérité moyenne ou sévère avec des doses croissantes de GM-CSF recombinants. Sur les 15 patients, 8 patients ont atteint les critères cliniques de rémission, et ce, avec un minimum d'effets secondaires alors que 4 patients ont eu une diminution de leur index de maladie de plus de 100 point où une diminution de 150 points du score de la maladie était considérée comme étant une rémission clinique (Dieckgraefe et Korzenik, 2002). En 2009, l'étude de Takazoe a obtenu des résultats similaires. En effet, aucune bioaccumulation systémique n'a été noté malgré des injections sous-cutanées journalières et 2 diminutions d'au moins 100 points de leur index de maladie sur les 5 patients de l'étude (Takazoe *et al.*, 2009).

Ces études de phases 1 ont été supplémentées par la suite par deux études cliniques de phase II randomisés en double aveugle. La première étude réunissant 124 participants n'a pas atteint son objectif primaire (c'est-à-dire une différence moyenne de 70 point d'index de maladie au jour 57 par rapport au groupe contrôle). Cette étude a néanmoins démontré une augmentation générale de la guérison des lésions intestinales ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie des

patients. Il est à noter que ces bénéfices étaient accompagnés d'effets secondaires variant de légers à modérés (Korzenik *et al.*, 2005). La seconde étude clinique de phase II comprenant 129 participants cortico-dépendants a su démontrer l'efficacité supérieure du GM-CSF recombinant comparativement au traitement placebo afin d'obtenir une rémission exempte de glucocorticoïdes. De plus, les auteurs de cette étude ont remarqué une augmentation significative de la qualité de vie des participants (Valentine *et al.*, 2009). Enfin, pour ce qui est des études utilisant le GM-CSF comme traitement, dans une étude pilote, Magno et collaborateurs ont traité par le GM-CSF recombinant trois participants avec une maladie de Crohn sévère et dont la maladie n'a pu être traitée par les thérapies conventionnelles. Dans les trois cas, le GM-CSF recombinant s'est révélé inefficace (Magno *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, de plus en plus d'études démontrent l'importance du GM-CSF dans l'homéostasie intestinale et la réponse inflammatoire, démystifiant peu à peu par le fait même son mécanisme d'action. La majorité des études suggère que le GM-CSF agit en modulant l'intégrité de la barrière épithéliale ainsi qu'en influençant le recrutement et la polarisation des monocytes et des cellules dendritiques (Egea *et al.*, 2010).

Connaissances et origine du projet

Récemment, notre équipe de recherche s'est intéressée à étudier en profondeur le rôle du GM-CSF dans le cadre du diabète de type 1. En générant des souris déficientes en GM-CSF et en enzyme de recombinaison RAG1 (NOD.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}), nous avons observé que ces souris mourraient systématiquement en bas âge comparativement à leurs congénères C57BL/6 ou NOD.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} *Csf2*^{+/-}*Rag1*^{-/-} ou *Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/-}. De façon préliminaire, nous avons fait analyser les différents organes par un pathologiste de chez Jackson Laboratory. Les résultats de pathologie ont révélé que les intestins de ces souris étaient enflammés mais la

nature de cette pathologie était inconnue. Ceci suggère que l'absence de la contribution du GM-CSF à la défense immunitaire, plus précisément innée, est néfaste à l'homéostasie intestinale. C'est ainsi, en se basant sur des connaissances actuelles sur le microbiome, le rôle du GM-CSF dans l'induction de la tolérance immunitaire périphérique et de ce modèle murin atteint de pathologie intestinale que le projet est né. En effet, notre laboratoire a précédemment démontré que le GM-CSF promeut la tolérance immunitaire via les DCs dans le contexte du diabète de type 1 (Gaudreau *et al.*, 2007). De plus, le potentiel thérapeutique pour le GM-CSF a été précédemment démontré pour la maladie de Crohn (Egea *et al.*, 2010). En prenant en considération que les ILC3 sont des cellules tolérogènes et les cellules majeures productrices de GM-CSF au niveau de l'intestin (Morthas *et al.*, 2014) et que selon la théorie de la tolérance microbienne, la tolérance orale est un facteur fondamental dans l'induction de la maladie de Crohn (Scott *et al.*, 2011), nos résultats préliminaires suggèrent la possibilité que le GM-CSF promeut la tolérance immunitaire intestinale envers le microbiome.

En accord avec les faits énumérés ci-dessus, nous proposons l'hypothèse que la pathologie intestinale observée chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}.*Rag1*^{-/-}, peut nous permettre de comprendre l'étiologie de la maladie de Crohn. En situation normale sans maladie, nous suspectons que les ILC3s interagissent avec le microbiome et les DCs afin de réguler la sécrétion de GM-CSF par les ILC3 et ainsi favoriser un environnement tolérogène. En effet, nous proposons qu'un défaut dans la régulation de la sécrétion du GM-CSF chez les cellules ILC3 et la privation du GM-CSF engagerait les fonctions immunogènes des DCs envers les antigènes luminaux des commensaux bactériens présentés par les DCs.

En accord avec notre hypothèse, l'équipe du Dr Myrad (Morthas *et al.*, 2014), a démontré que la déficience en production de GM-CSF altère les fonctions des macrophages, réduit le nombre de Treg et dérégule la tolérance orale dans un contexte colonique. Dans ces travaux, le focus a été porté sur l'interaction entre les

macrophages et les ILC3 alors que le mécanisme de perte de tolérance orale n'a été qu'effleuré comme étant une dérégulation des populations de cellules dendritiques. C'est fragmentant le système immunitaire en utilisant un modèle murin déficient en système immunitaire adaptatif (C57BL/6.Rag1^{-/-}) que nous pensons pouvoir démystifier l'importance du GM-CSF dans l'immunité et la tolérance immunitaire périphérique innée et la pathogénèse de la maladie de Crohn. L'avancement des connaissances fondamentales sur cette maladie multifactorielle est essentiel au développement d'une thérapie curative. C'est dans l'optique d'éclaircir ce sujet que les travaux entrepris dans ce mémoire ont débuté.

Hypothèse/problématique

Le GM-CSF promeut la tolérance immunitaire intestinale envers le microbiome.

Objectifs

Objectif #1 : Examiner l'impact de la délétion du GM-CSF sur la physiologie et l'histologie du tractus intestinal chez la souris C57BL/6.

Objectif #2 : Déterminer les mécanismes sous-jacents aux pathologies des souris déficientes en GM-CSF.

MATERIEL ET METHODES

1. Modèles murins, génotypage et suivi du poids des animaux

Les souris C57BL/6 ont été élevées et reproduites dans un environnement standard contrôlé (20°C et un cycle lumière/noirceur de 12h) ou dans un environnement sans pathogènes spécifiques (SPF) avec un accès *ad libitum* à de la nourriture (Purina Chow) et à de l'eau. Les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} ont été fournies par Dr Stevenson et ont été croisées avec les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}.*RAG1*^{-/-} pour générer les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}.*RAG1*^{-/-}. Le génotypage des souris fut effectué selon les conditions détaillées dans le **Tableau 1**. La survie et le gain de poids des souris furent examinés à intervalle d'une semaine sur une période de 24 semaines à l'aide d'une balance électronique et par le décompte des souris décédées ou gravement malade nécessitant l'euthanasie dans les conditions des animaleries respectives. Le protocole animal a été approuvé par le comité d'éthique de santé animale de l'Université de Sherbrooke et les expériences ont été réalisées selon les recommandations du guide canadien des soins et utilisations des animaux de laboratoire.

Tableau 1 : Détails du protocole de génotypage des souris *Csf2.Rag1*

Amorces pour le génotypage de <i>Csf2</i>	Conditions de PCR
5'-AATGAAGAGGTAGAAGTCGTC-3'	Activation de l'enzyme : 94°C, 5min Cycles : 40 Dénaturation : 94°C, 20 sec Hybridation : 57°C, 30 sec Élongation : 72°C, 1 min Élongation : finale 72°C, 10min
5'-TGCTCGAATATCTTCAGG-3'	
5'-AGGCCACTTGTGTAGCGCCAAGT-3'	
Amorces pour le génotypage de <i>Rag1</i>	Activation de l'enzyme : 94°C, 2min Cycles : 40 Dénaturation : 94°C, 30sec Hybridation : 57°C, 45sec Élongation : 72°C, 45sec Élongation finale : 72°C, 45sec
5'-GAGGTTCCGCTACGACTCTG-3'	
5'-CCGGACAAGTTTTTCATCGT-3'	
5'-TGGATGTGGAATGTGTGCGAG-3'	

2. Histologie

Les intestins et les côlons furent nettoyés à la main dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), (GIBCO), rincés à la paraformaldéhyde 4 % (Fisher), fixés dans une solution de formalin (Moolenbeek et Ruitenberg, 1981). Les tissus sont préparés et inclus dans des blocs de paraffine (Service de pathologie du centre hospitalier universitaire de l'université de Sherbrooke), coupés en tranches de 5µm à l'aide d'un microtome, montés sur des lames et ensuite colorés à l'hématoxyline et éosine. Le même processus a été appliqué aux poumons qui ont été préalablement vidés de leur sang par injection de PBS dans l'oreillette droite.

3. Isolation des cellules immunitaires de la *lamina propria*

Premièrement, les intestins et les côlons furent découpés longitudinalement et transversalement, puis nettoyés par agitation dans une solution de PBS. Deuxièmement, les boyaux furent traités à l'EDTA 5mM (Sigma) pendant 20 minutes à 37°C avec agitation, récupérés sur une passoire et lavés deux fois au PBS. Troisièmement, les boyaux furent coupés à l'aide d'un scalpel puis digérés pendant 20 minutes (30 minutes pour les côlons) à 37°C avec agitation à l'aide d'un cocktail d'enzymes (Collagénase de type 4, 250U/mL (Worthington), Dnase 1 50U/mL (Roche), Dispase II 0,5mg/mL (Sigma), 10% FBS, 5% penicillin-streptomycin, dans du milieu Dubelcco's modification of eagle's medium (DMEM) (Wisent). Quatrièmement, les digestions furent filtrées une fois sur un filtre de 70µM, puis filtrés de façon séquentielle sur deux filtres de 40µM en nettoyant les filtres avec du DMEM contenant 10% Sérum fœtal bovin (FBS), (GIBCO) et ensuite centrifugés 10 minutes à 4°C. Cinquièmement, les cellules furent traitées au chlorure d'ammonium (140 mM) (Fisher) deux minutes à température pièce, puis centrifugés 500g pendant 10 minutes à 4°C. Finalement, les cellules furent resuspendues dans le tampon de cytométrie en flux et comptées.

4. Cytométrie en flux

Toutes les acquisitions furent effectuées en utilisant un cytomètre en flux Cytoflex 20 2L/6C et les analyses en utilisant le logiciel CytExpert (Beckman). Brièvement, les cellules ont été suspendues dans le tampon de cytométrie de PBS contenant 0,2% de BSA. Les cellules ont été ensuite marquées dans ce même tampon pendant 20 minutes à température pièce avec la combinaison d'anticorps appropriées (**Tableau 2**), lavées et analysées en cytométrie de flux. Dans le cas du marquage intracellulaire de Foxp3, le marquage a été effectué en utilisant le kit commercial de marquage intracellulaire selon le protocole recommandé par le fabricant (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, eBioscience).

Tableau 2 : Détails des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

Anticorps	Compagnie
Anti CD4-APC	eBioscience
Anti CD8-PerCP5.5	eBioscience
Anti CD19- PE	BD Bioscience
Anti Foxp3- FITC	eBioscience
Anti CD25- PE/Cy7	eBioscience
Anti CD11b-FITC	BD Bioscience
Anti CD11c-APC/Cy7	Biolegend
Anti CMHII I-A/I-E-PerCP5.5	Biolegend
Anti GR1-PE	eBioscience
Anti F4/80-PerCP5.5	eBioscience
Anti CD103- PE/Cy7	Biolegend

5. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

L'ARN a été isolé à l'aide du Trizol (Ambion Life Technologie) et retranscrit en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit commercial Reverse transcription kit, (Quantitech). En utilisant un kit de qPCR (TAQ DNA polymerase, New England BioLabs), les niveaux d'expression des gènes d'intérêts furent évalués (Rotor-Gene, RG-3000, Corbelt Research) et analysés comparativement au niveau d'expression de HPRT de l'échantillon. L'amplification par qPCRs des gènes d'intérêt fut confirmée par migration des produits PCR sur un gel d'agarose 2%.

Les conditions de qPCR pour différents gènes sont décrites dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Détails des conditions de qPCR des gènes d'intérêts*¹

Gène d'intérêt	Amorce (sens et anti-sens)	Température d'hybridation (°C)
<i>Il1b</i>	5'-TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3' 5'-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3'	55
<i>Il18</i>	5'-GCCATGTCAGAAGACTCTTGCGTC-3' 5'-GTACAGTGAAGTCGGCCAAAGTTGTC-3'	60
<i>Il33</i>	5'-CTGCGTCGTTTGACACATT-3' 5'-CACCTGGTCTTGCTCTTGGT-3'	55
<i>Tslp</i>	5'-CTGAGAGAAATGACGGTACTCAGG-3' 5'-GGAGATTGCATGAAGGAATACCAC-3'	55
<i>Tgfb2</i>	5'-GCTGGTGAAACGGAAG-3' 5'-GCGTTGTTGCGGTCCA-3'	60
<i>Il22</i>	5'-ATGCTGGATTGCAGAGCAGTA-3' 5'-ACGGGGGCACATTATTTTGTAGTCT-3'	57
<i>IL23A</i>	5'-GCCCCGTATCCAGTGTGA-3' 5'-GCTGCCACTGCTGACTAG-3'	55
<i>Il27</i>	5'-CTGTTGCTGCTACCCTTGCTT-3' 5'-CACTCCTGGCAATCGAGATTC-3'	60
<i>HPRT</i>	5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' 5'-GATTCAACTTGCTCTCATCTTAGGC-3'	55, 57 ou 60

2. Évaluation de l'inflammation intestinale

L'évaluation de l'inflammation intestinale et colonique a été déterminée par l'examen des six paramètres cliniques précédemment décrit (Kim et al, 2012,

¹ Les conditions de qPCR sont communes à tous les gènes d'intérêts, sauf la température d'hybridation (spécifiée dans le **Tableau 3**) : Activation de l'enzyme : 95°C pendant 7min, nombre de Cycles : 45, Dénaturation : 95°C, pendant 15 sec, température d'hybridation : variable selon le gène d'intérêt pendant 30 sec, Élongation : 72°C pendant 20 sec, Élongation : finale 72°C pendant 10min

Perse et al, 2012, Dieleman et al, 1998). Ces paramètres sont décrits dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Détails de l'évaluation de l'inflammation intestinale

Paramètre étudié	Description du paramètre	Score associé
Perte de poids* ²	1 à 5 %	1
	6 à 10 %	2
	11 à 20 %	3
	Plus que 21 %	4
Variation de la longueur de l'intestin ou du côlon	100-96 %	0
	95-86 %	1
	85-76 %	2
	75-65 %	3
	66 % et moins.	4
Consistance des fèces	Fèces normales	0
	Fèces semi-liquides	2
	Diarrhée	4
Sang dans les fèces	Absence de sang	0
	Coloration légère	2
	Coloration intense	4
Saignement rectale	L'absence de saignements	0
	La présence du sang sur l'anus	2
	Les saignements abondants	4
Inflammation visuelle (prolapse)	Absence de prolapse	0
	Signes de prolapse	1
	Prolapse évident	2
	Prolapse grave	3

6 Logiciel d'analyse statistique

L'élaboration des figures ainsi que l'analyse statistique furent effectuées grâce au logiciel GraphPad Prism 7.

²Le score de la perte de poids a été comptabilisé jusqu'à un score maximum de 4. Par exemple, une souris peut avoir perdu 6 à 10% de son poids initial une semaine (score de 2), puis avoir eu une continuation de perte de poids vers un score de 3 (ou encore un second épisode de score de 3). Dans les deux cas, le score comptabilisé pour cette souris est de 3.

Résultats

1. Suivi et analyses des souris déficientes en GM-CSF

1.1 Étude de la survie et du gain de poids

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à savoir si la déficience en GM-CSF (*Csf2*^{-/-}) affecte le développement des souris immunocompétentes C57BL/6.*Rag1*^{+/+} et des souris immunodéficientes C57BL/6.*Rag1*^{-/-}. Pour cela, nous avons donc suivi la survie et le gain de poids des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-}. Les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{+/+} sont utilisées comme contrôles. Ces analyses ont été faites lors de l'hébergement des souris dans l'animalerie standard.

L'analyse des courbes de survie a montré que seules les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-} ont une grande mortalité (39,1%) en comparaison aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{+/+}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{-/-}. Cette différence de mortalité est observée dès la troisième semaine après la naissance et se maintient jusqu'à la fin des 24 semaines de la période de l'étude (**Figure 3A**). Ces résultats suggèrent que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-} meurent d'une pathologie associée à l'absence du GM-CSF dans le système immunitaire inné étant donné qu'aucune mortalité n'est observée chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{+/+}. Par conséquent, nous proposons comme hypothèse que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{-/-} sont protégées contre l'inflammation dû à la présence du GM-CSF et, que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{+/+} sont protégées contre l'inflammation par la présence du système immunitaire adaptatif qui est en mesure de pallier à l'absence de GM-CSF. De façon intéressante, les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{+/+} n'ont pas une mortalité significative sur la période de l'étude, malgré la mortalité accentuée répertoriée dans la littérature (Seymour et al, 1997). De plus, l'absence de mortalité des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{-/-} sur la période de l'étude suggère une

absence de pathogènes dans l'étude, car ces souris sont reportées être très sensibles aux agents pathogènes étant donné qu'elles n'ont pas de système immunitaire adaptatif.

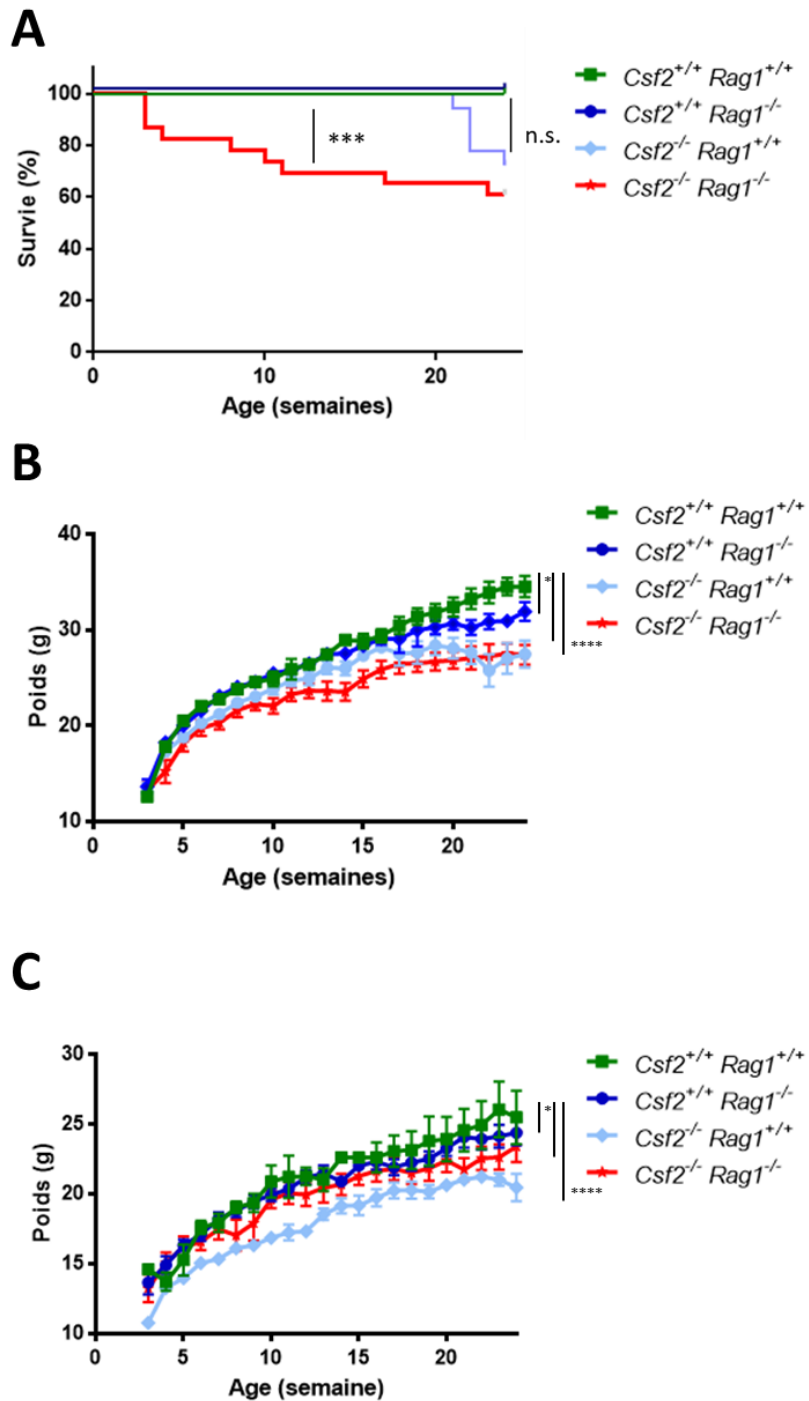


Figure 3 : Les souris C57BL/6 déficientes en GM-CSF ont un gain de poids diminué et meurent de façon significative comparativement aux souris contrôles.

A) Sans stimulus, la survie des différents génotypes de souris fut examinée à intervalle de une semaine sur une période de 24 semaines. Sur cette même période, la prise de poids des souris fut effectuée en distinguant B) la prise de poids des mâles et C) la prise de poids des femelles. La courbe de survie est représentative de $n > 15$ souris par génotype et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur où ***: $p < 0,001$. La courbe de prise de poids est représentative de $n > 5$ souris par génotype et par sexe, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur où *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$ et ****: $p < 0,0001$.

Sur cette même période de temps, nous avons aussi pris le poids des souris ayant les différents génotypes générés (**Figure 3B et Figure 3C**). Ainsi, la prise de poids classifiée du plus petit au plus grand (avec différence significative entre chacun des génotypes) pour les mâles est C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}, C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/-}, C57BL/6.Csf2^{+/-}Rag1^{-/-} et C57BL/6.Csf2^{+/-}Rag1^{+/-} et pour les femelles C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/-}, C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}, C57BL/6.Csf2^{+/-}Rag1^{-/-} et C57BL/6.Csf2^{+/-}Rag1^{+/-}. En effet, bien que les souris C57BL/6.Csf2^{+/-}Rag1^{-/-} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/-} n'ont pas une mortalité significative sur la période de l'étude, elles sont en moyenne plus maigres que les souris C57BL/6.Csf2^{+/-}Rag1^{+/-}. D'autre part, fait notable, les souris déficientes en GM-CSF (C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/-} ou C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}) sont plus maigres que les souris C57BL/6.Csf2^{+/-}Rag1^{-/-}, suggérant donc une aggravation des lésions intestinales lorsque la délétion du GM-CSF est couplée à la délétion du système immunitaire adaptatif. Ainsi, il est donc possible de conclure de ces résultats qu'il existe un lien entre le système immunitaire, le GM-CSF et la mortalité accrue des souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}. Ainsi, des résultats de suivi du taux de mortalité et du gain de poids (**Figure 3**), nous pouvons conclure que les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-} sont atteintes d'une maladie chronique potentiellement mortelle associée à une dérégulation du système immunitaire inné.

Fait inexpliqué, en fonction de leur sexe, les souris C57BL/6 ne réagissent pas de façon similaire à la délétion du GM-CSF. Effectivement, les femelles C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} sont en moyennes plus maigres que les trois autres génotypes, tandis que dans le cas des mâles, ce sont les C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} qui sont les souris les plus maigres.

1.2 Étude phénotypique de l'inflammation intestinale.

Sachant que les souris déficientes en GM-CSF ont une susceptibilité intestinale à l'inflammation induite au DSS (Xu et *al*, 2008), nous nous sommes penchés à évaluer s'il y avait de l'inflammation intestinale chez les 3 différents génotypes de souris générées. En nous référant à notre méthode d'évaluation décrite plus haut des symptômes associés à l'inflammation intestinale (*Voir section Matériel et méthode*), nous n'avons pas noté de rétrécissement de l'intestin et du côlon, ni de variation dans la consistance des fèces, ni de saignements dans la région anale, ni de présence de sang dans les fèces ou de signes d'inflammation visuels de la région anale, et ce, pour les trois génotypes de souris générés. L'ensemble de ces résultats suggère une absence d'inflammation intestinale. Néanmoins, nous avons pu remarquer des épisodes de pertes de poids chez les souris déficientes en GM-CSF à savoir les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} (**Figure 4**), justifiant ainsi un score global d'inflammation intestinale significatif pour les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. Il est à noter que seul le graphique de perte de poids épisodique est présenté, et ce, pour des raisons d'esthétisme, puisque les autres critères analysés obtenaient des évaluations aux valeurs nulle pour chacun des génotypes alors que le graphique du score DAI était un réplique visuel de la perte de poids épisodique. Ainsi, bien que le score de l'index de la maladie total indique une maladie intestinale, la vision élaborée du score d'inflammation suggère autrement. En effet, les souris bien que malades ne semblent pas avoir de maladie intestinale selon l'analyse macroscopique.

Conséquemment, une évaluation plus poussée de ces résultats, indique des épisodes de pertes de poids chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} en plus d'évoquer des périodes passagères d'une maladie chronique inconnue.

En effet, à cette étape de ce mémoire, nos résultats suggèrent donc que la maladie observée chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} est associée à la perte de l'expression du GM-CSF, plutôt qu'à l'absence du système immunitaire adaptatif. Cette conclusion est appuyée par le fait que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} ne sont pas atteintes d'épisodes de perte de poids tel que démontré par la figure 4.

De plus, en prenant en considération les résultats de la figure 3 et de la figure 4, les résultats suggèrent que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} ont phénotype pathologique intermédiaire entre les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, et les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. En effet, alors que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} ont une légère diminution perte de poids par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} ont une diminution accentuée de gain de poids alors que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont une diminution considérable de leur gain de poids en plus d'une mortalité élevée.

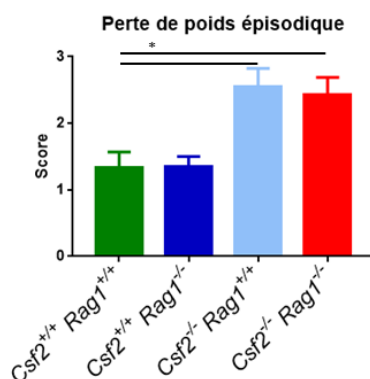


Figure 4 : Évaluation de l'index de l'activité de la maladie (DAI) chez les différents génotypes de souris C57BL/6.

Selon les critères évoqués (**Tableau 4**), la perte de poids épisodique, le rétrécissement de l'intestin ou du côlon, la consistance des fèces, la présence de saignements de la région anale, la présence de sang dans les fèces, l'inflammation visuelle ainsi que le score de DAI total moyen fut mesuré pour les différents génotypes de souris. Il est à noter que seul le graphique de perte de poids épisodique est présenté, et ce, pour des raisons d'esthétisme, puisque les autres critères analysés obtenaient des évaluations aux valeurs nulle pour chacun des génotypes alors que le graphique du score DAI était un réplica visuel de la perte de poids épisodique. Les résultats sont représentatifs de $n > 15$ souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM. La signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur où *: $p < 0,05$.

2. Étude histopathologique intestinale et colonique

Dans un second temps, malgré la faible chance que des anomalies intestinales ou coloniques soient observées, nous avons effectué une histopathologie suivie d'une coloration hématoxyline/éosine sur l'intestin et côlon des souris de différents génotypes. Étonnement, nous avons remarqué des signes clairs d'inflammation intestinale et colonique chez les souris C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{-/-} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-} (**Figure 5**).

Effectivement, tandis que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} et les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} ne développent pas de lésions intestinales ou coloniques, les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} développent de petites lésions intestinales et coloniques (diamètre = 100-500µM) composées d'une masse compacte et focalisée de cellules nucléées restreintes à la *lamina propria* qui se retrouvent dispersées tout au long de l'intestin et du côlon. À titre comparatif, les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} développent de larges foyers d'inflammation intestinaux et coloniques (diamètre = 500-1000µM) composées d'une masse compacte

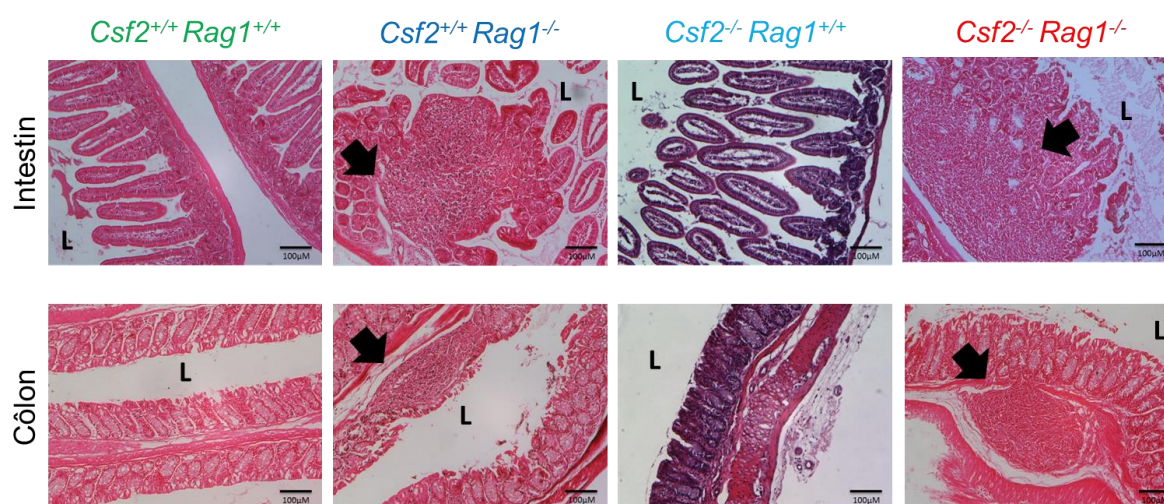


Figure 5 : Les souris C57BL/6 *Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} développent de larges foyers d'inflammation intestinale et colonique.

Histologie représentative comparative de l'intestin et du côlon des souris des différents génotypes où les flèches pointent les foyers d'inflammation et où L indique le lumen intestinal. Sur coupe de tissus colorée à l'hématoxyline et l'éosine, les observations histologiques ont été effectuées en aveugle sur l'intestin ou côlon de souris en condition non-stimulé. Les résultats sont représentatifs de n>3 souris par génotype.

et focalisée de cellules nucléées. De plus, les lésions sont dites de type transmurale (voir en annexe pour une photo plus représentative de la taille des foyers d'inflammation des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} (**Figure 15**)), c'est-à-dire, que les lésions altèrent aussi bien la couche basal de l'épithélium, la *lamina propria* et la couche musculaire de l'intestin ou du colon. De plus, ces foyers

lésionnels peuvent se retrouver tout au long de l'intestin et du côlon. Aussi bien chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} on dénote aux foyers d'inflammation une déformation locale des villosités résultant de l'hyperplasie causée par l'infiltration cellulaire. De plus, il est à noter que l'histologie n'a révélé aucun cas de présence d'abcès, de granulomes, de nodules, de formation de follicules lymphoïdes tertiaires, de néoplasie ou de perte d'intégrité épithéliale.

L'absence d'altérations intestinale et colonique chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} ne corrobore pas avec les données d'un travail précédemment publiées (Seymour et *al*, 1997). Ainsi, selon nos résultats, l'absence de lésions chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} suggère que l'absence de GM-CSF n'est pas suffisante pour l'apparition de lésions intestinales. Les résultats suggèrent plutôt que les souris C57BL/6 doivent être immunodéficientes pour que l'absence de GM-CSF potentialise la gravité des lésions. De plus, étant donné que l'absence de lésions chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} ne corrèle pas avec la maladie chronique périodique énoncée précédemment, suggère la présence d'un facteur de confusion.

Donc, avant de déterminer la composition des populations immunitaires intestinales et coloniques chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}, nous avons concentré nos efforts sur l'étude des facteurs de confusions potentiels probants pouvant influencer l'analyse des résultats de l'étude générale.

3. Étude des facteurs de confusion

3.1 Étude de la présence d'un pathogène

Le premier facteur de confusion potentiel le plus évident est l'avènement d'une maladie associée à la présence d'un pathogène. Pour appuyer cette possibilité,

nous avons donc réalisé une étude de gain de poids et de taux de mortalité des souris de différents génotypes, dans un environnement <<specific pathogen free>> (SPF). Bien que ce facteur de confusion ne peut être totalement exclus que par l'utilisation d'un spectre large d'antibiotique, l'utilisation d'une seconde animalerie <<plus propre>> nous permet d'exclure la majorité des pathogènes les plus fréquents ou virulents pouvant altérer les résultats scientifiques. En conditions SPF, nos résultats montrent encore une fois que seules les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont une mortalité significative (mortalité de 30,0%), comparativement aux données obtenues avec les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} (**Figure 6A**). Cette différence est observée dès les premières semaines après la naissance et continue jusqu'à la fin des 24 semaines de la période de l'étude. En comparant les courbes de gain de poids obtenus dans l'environnement SPF, nous avons observé la même tendance de gain de poids lorsque les études sont réalisées dans l'animalerie standard pour les souris C57BL/6. Ainsi, on peut classer la prise de poids du plus petit au plus grand pour les mâles dans l'ordre suivant : C57BL/6.*Csf2*^{-/-}.*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}.*Rag1*^{+/+}, C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 6B**).

Cependant, de façon surprenante, l'analyse des courbes de poids des souris femelles (**Figure 6C**) montre que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} prennent plus de poids que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} en animalerie SPF. Ces résultats ne semblent pas corroborer les résultats obtenus avec les souris femelles hébergées à l'animalerie standard.

En résumé, si l'on omet cette singularité, les résultats nous permettent d'appuyer le fait que l'étude est exempte de pathogènes ou encore que leur présence n'affecte pas le gain de poids et la survie des souris C57BL/6. Encore une fois, nous répétons que nous n'excluons pas la possibilité qu'un pathogène peu connu puisse biaiser les résultats.

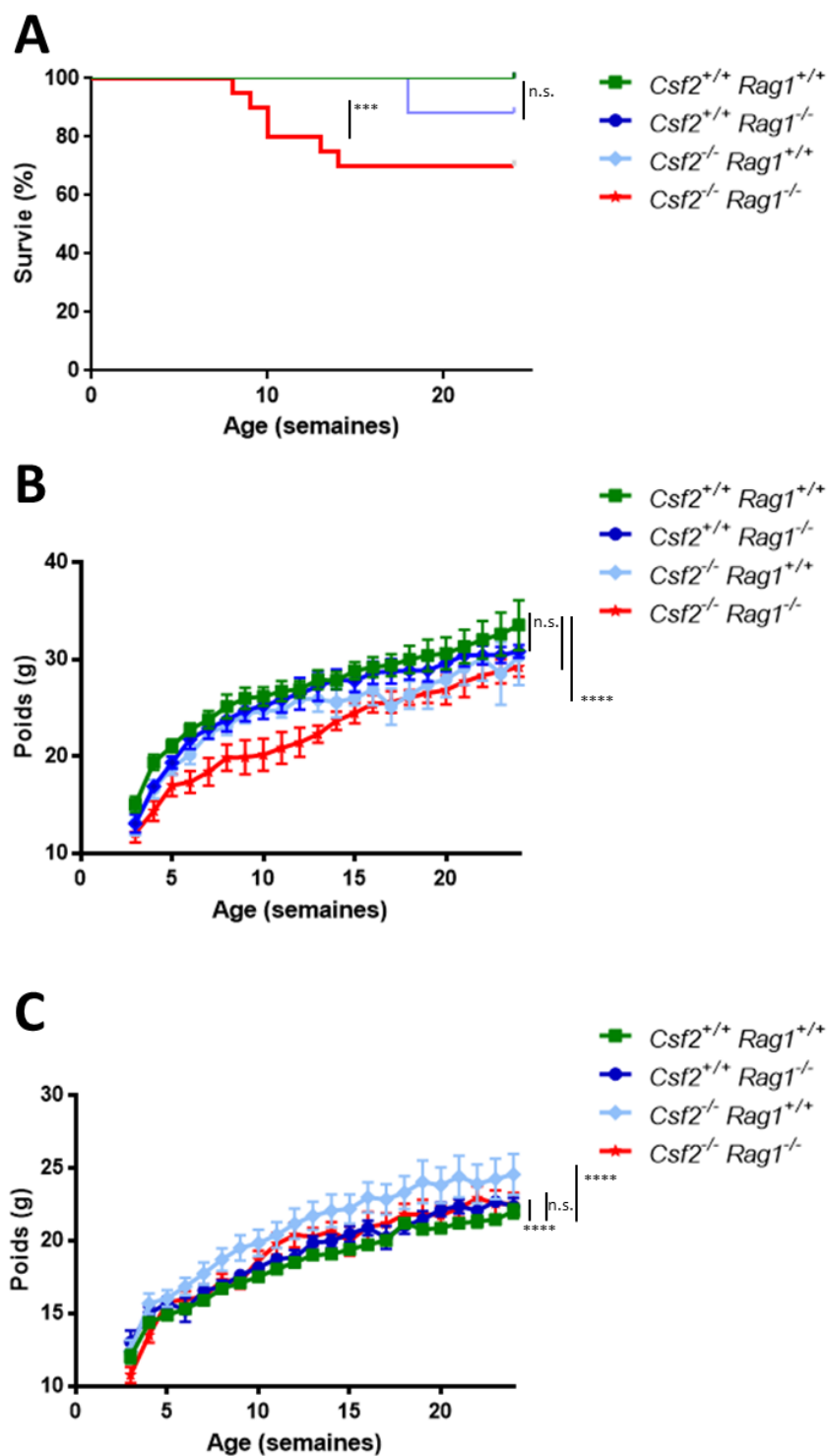


Figure 6 : Les souris C57BL/6 déficientes en GM-CSF ont un gain poids diminué et meurent de façon significative comparativement aux souris contrôles en absence de pathogène.

A) Sans stimulus, en animalerie SPF, la survie des différents génotypes de souris fut examiné à intervalle de une semaine sur une période de 24 semaines. Sur cette même période, la prise de poids des souris fut effectuée en distinguant B) la prise de poids des mâles et C) la prise de poids des femelles. La courbe de survie est représentative de $n > 10$ souris par génotype et la signification statistiques a été déterminé par le test de variance d'ANOVA à un facteur où *: $p < 0,05$. La courbe de prise de poids est représentative de $n > 4$ souris par génotype et par sexe, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur où *: $p < 0,05$, et ****: $p < 0,0001$.

3.2 Étude histopathologique pulmonaire

Il est rapporté dans la littérature que les souris déficientes en GM-CSF peuvent être atteintes de lésions pulmonaires (Seymour et al, 1997). Dans le cadre de notre étude, il est envisageable que le développement d'une pathologie pulmonaire serait un facteur contribuant à la mortalité des souris déficientes en GM-CSF. Nous avons donc effectué une analyse histopathologique des poumons des souris de différents génotypes et nous remarqué que les souris déficientes en GM-CSF, C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/+} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}, ont effectivement plusieurs lésions pulmonaires constituées de cellules nucléées (**Figure 7**). Ces foyers d'inflammation, sans forme précise et ayant diamètre variant entre 100 μ m et 500 μ m. De plus, ces foyers d'inflammation se retrouvent à plusieurs localisations péribronchiolaires, donnant un aspect semblable à une bronchiolite cellulaire, bien que la contraction et le rétrécissement des bronches soit beaucoup moins marqué dans la pathologie observée comparativement à la bronchiolite cellulaire. De plus, Il est aussi à noter l'absence de granulomes, de formation de follicules lymphoïdes tertiaires ou d'altération fonctionnelle des alvéoles (fibrose, emphysème ou obstruction).

Ces résultats suggèrent que les lésions pulmonaires dont souffrent les souris déficientes en GM-CSF sont un autre facteur important dont il faut tenir compte pour comprendre la perte de poids et la baisse du taux de survie chez ces souris. En conclusion, en se basant sur ces nouvelles données, il est important de ne pas dissocier la contribution des pathologies pulmonaires, de la contribution des pathologies intestinales ou coloniques, à la diminution de gain de poids des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la contribution de ces lésions à la mortalité des souris déficientes en GM-CSF

Cependant, seules les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont de graves lésions intestinales et seules ces souris ont une mortalité élevée et significative pendant les 25 semaines de l'étude. Donc, on peut conclure que le GM-CSF participe sans équivoque à la défense immunitaire intestinale.

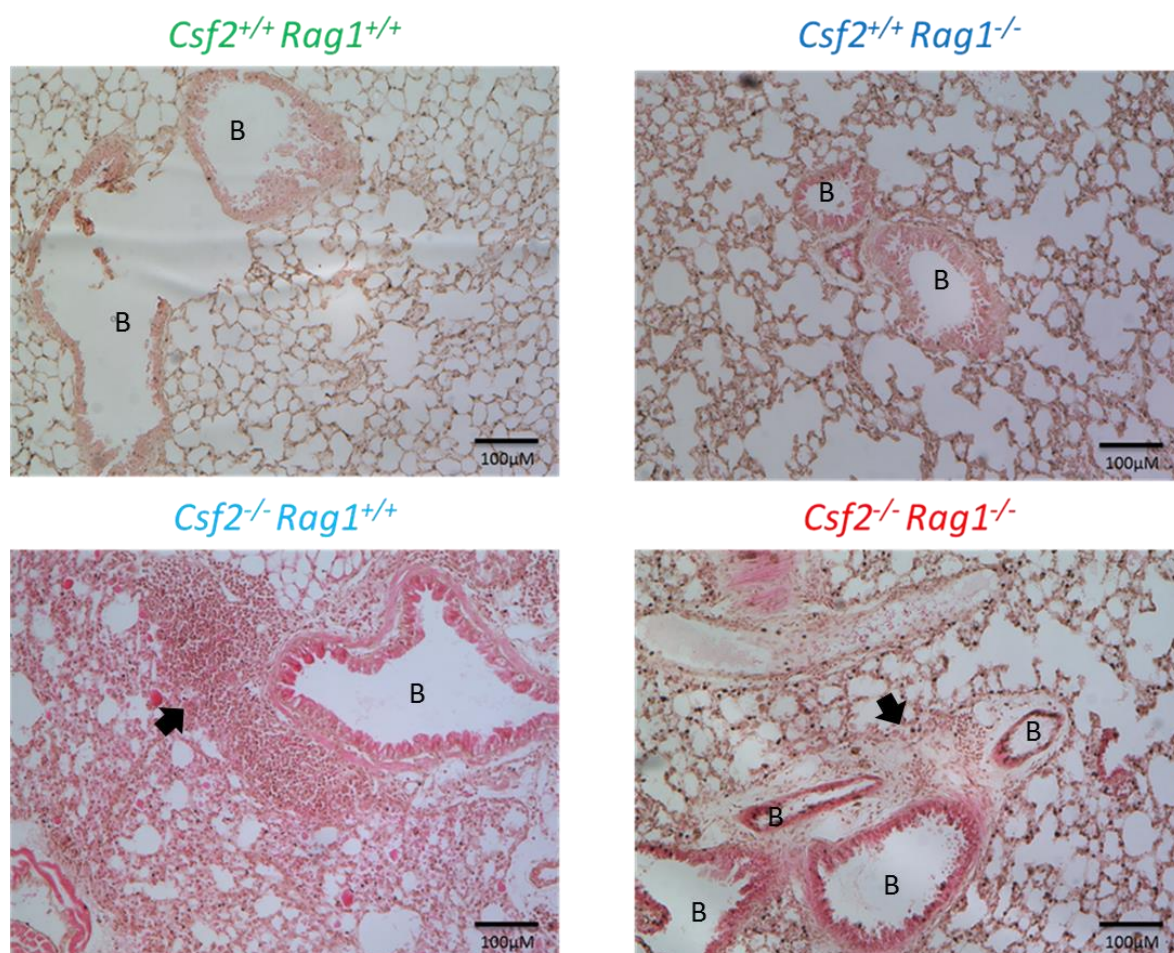


Figure 7: Les souris C57BL/6 *Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et *Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont des larges foyers d'inflammation pulmonaire.

Histologie représentative comparative de l'intestin et du côlon des souris des différents génotypes où B indique les bronchioles et les flèches les foyers d'inflammation cellulaires. Sur coupe de tissus colorée à l'hématoxyline et l'éosine, les observations histologiques ont été effectuées en aveugle sur les poumons de souris non-stimulés. Les résultats sont représentatifs de $n > 3$ souris par génotype.

4. Étude des populations cellulaires immunitaires intestinales et coloniques

4.1 Étude des populations de DCs intestinales et coloniques

Dans cette partie de notre étude, nous nous sommes penchés sur l'identification du mécanisme physiopathologique intestinal et coloniques qui expliquent la nature de ces lésions. Puisque l'analyse pathologique des intestins et du colon tel que observé en microscopie montre des lésions similaires dans les deux organes, suggèrent donc de prime abord que le mécanisme de développement de ces lésion soit commun aux deux organes.

Étant donné que les souris ayant des lésions intestinales sont immunodéficientes, nous avons commencé par l'évaluation des différentes populations cellulaires immunitaires innées. Les DCs furent le premier type cellulaire étudié étant donné leur rôle associé à la tolérance orale. Brièvement, à l'étude des majeures populations des DCs intestinales, c'est-à-dire les cellules CD11c⁺CMH-II^{high}CD103⁺CD11b⁻, CD11c⁺CMH-II^{high}CD103⁻CD11b⁺ et CD11c⁺CMH-II^{high}CD103⁺CD11b⁺, il est possible de constater le débalancement de ces populations dans le petit intestin des souris C57BL6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-} (**Figure 8A**). Ainsi, nos résultats de cytométrie de flux montrent que les proportions de DCs intra-intestinales des souris C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{-/-} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/+} sont similaires à celles des souris C57BL6.Csf2^{+/+}Rag1^{+/+} alors que les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-} ont une augmentation de leur proportion de DCs tolérogènes CD11c⁺CMH-II^{high}CD103⁺CD11b⁻ au détriment de leurs DCs immunogènes CD11c⁺CMH-II^{high}CD103⁺CD11b⁺ (**Figure 8B**). Comparativement aux souris C57BL6.Csf2^{+/+}Rag1^{+/+}, les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-} ont un nombre similaire de cellules intestinales CD11c⁺CMH-II^{high}CD103⁺CD11b⁻ ou CD11c⁺CMH-II^{high}CD103⁺CD11b⁺ (**Figure 8D**). Ces résultats suggèrent que les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-} ont une altération au niveau de leur tolérance périphérique intestinale en lien avec le débalancement du ratio des populations de DCs

tolérogènes et immunogènes. De plus, ces résultats suggèrent que l'absence du GM-CSF promeut un phénotype immunotolérant chez les DCs intestinaux des souris CC57BL6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}.

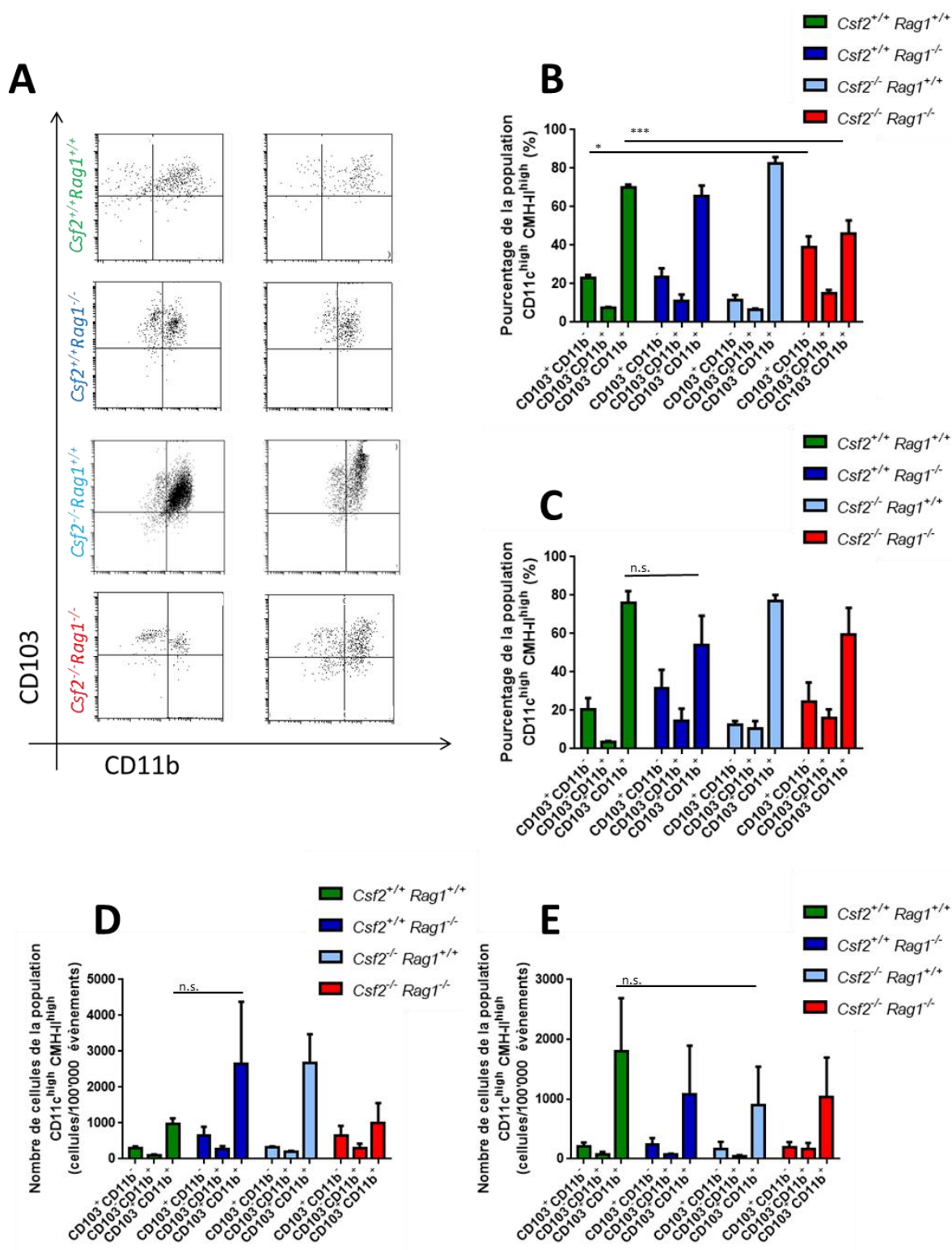


Figure 8 : Évaluation des proportions des populations de cellules dendritiques intestinales et coloniques ainsi que leur nombre absolu des différents génotypes de souris C57BL/6.

A) Résultats visuels représentatifs de cytométrie de flux ajusté à l'affichage des 10^5 premiers événements. B) Proportions des populations de DCs pour l'intestin et C) pour le côlon des différents génotypes de souris C57BL/6. Les résultats sont représentatifs de $n > 3$ souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à deux facteurs où * : $p < 0,05$ et *** : $p < 0,001$. D) Nombre absolu des populations de DCs pour l'intestin et E) pour le côlon des différents génotypes de souris C57BL/6. Le nombre de cellules pour chaque échantillon a été normalisé à 10^5 . Les résultats sont représentatifs de $n > 3$ souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à deux facteurs.

Cependant, l'analyse des populations des DCs coloniques n'a pas révélé de changement dans les proportions des populations de DCs coloniques par rapport aux DCs des souris C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{+/+} (**Figure 8C**) ni de changement dans le nombre total de ces populations de DCs (**Figure 8E**).

Ainsi, les changements répertoriés des populations de DCs colonique ne semblent pas expliquer l'origine des lésions observées chez les souris C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{-/-} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}. De plus, cette modulation différentielle des populations dendritiques entre l'intestin et le côlon murin suggère deux pathogénèses différentes dont l'une est spécifique à l'intestin et l'autre au côlon.

4.2 Nombre de neutrophiles intestinaux et coloniques

Continuant l'évaluation des différentes cellules du système immunitaire inné, nous avons dénombré les neutrophiles qui pourrait être un contributeur majeur à anomalies observées chez les souris déficientes en GM-CSF (**Figure 9A**). Effectivement, l'analyse de l'infiltrat cellulaire au niveau de l'intestin des souris

C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} a montré une tendance à contenir plus de cellules GR1⁺ comparativement aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (respectivement multiplié par un fold de 9.0/ 8.2/ 9.5) (**Figure 9B**). Ainsi, la nature des lésions intestinales pourrait être de type neutrophilique. Cependant, il est à noter que le profil du nombre de neutrophiles ne correspond pas au profil de la maladie aperçu en microscopie. Effectivement, seules les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont des lésions intestinales alors que nous observons une hausse des neutrophiles dans le génotype C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}.

Dans le colon, le profil du nombre de neutrophiles est similaire à celui aperçu dans l'intestin (**Figure 9A**). Effectivement, l'analyse des colons des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}, et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont tendance à avoir plus de cellules GR1⁺ par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (respectivement multiplié par un fold de 22.0/ 31.3/ 5.4) (**Figure 9C**). Ainsi, il est possible que les lésions coloniques soient de nature neutrophilique.

En résumé, les neutrophiles semblent être impliqués dans les pathologies observées. Étant donné le nombre de neutrophiles obtenus dans les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}, il est étonnant que des lésions dans l'intestin et le côlon de ceux-ci n'ont pas été observées en microscopie.

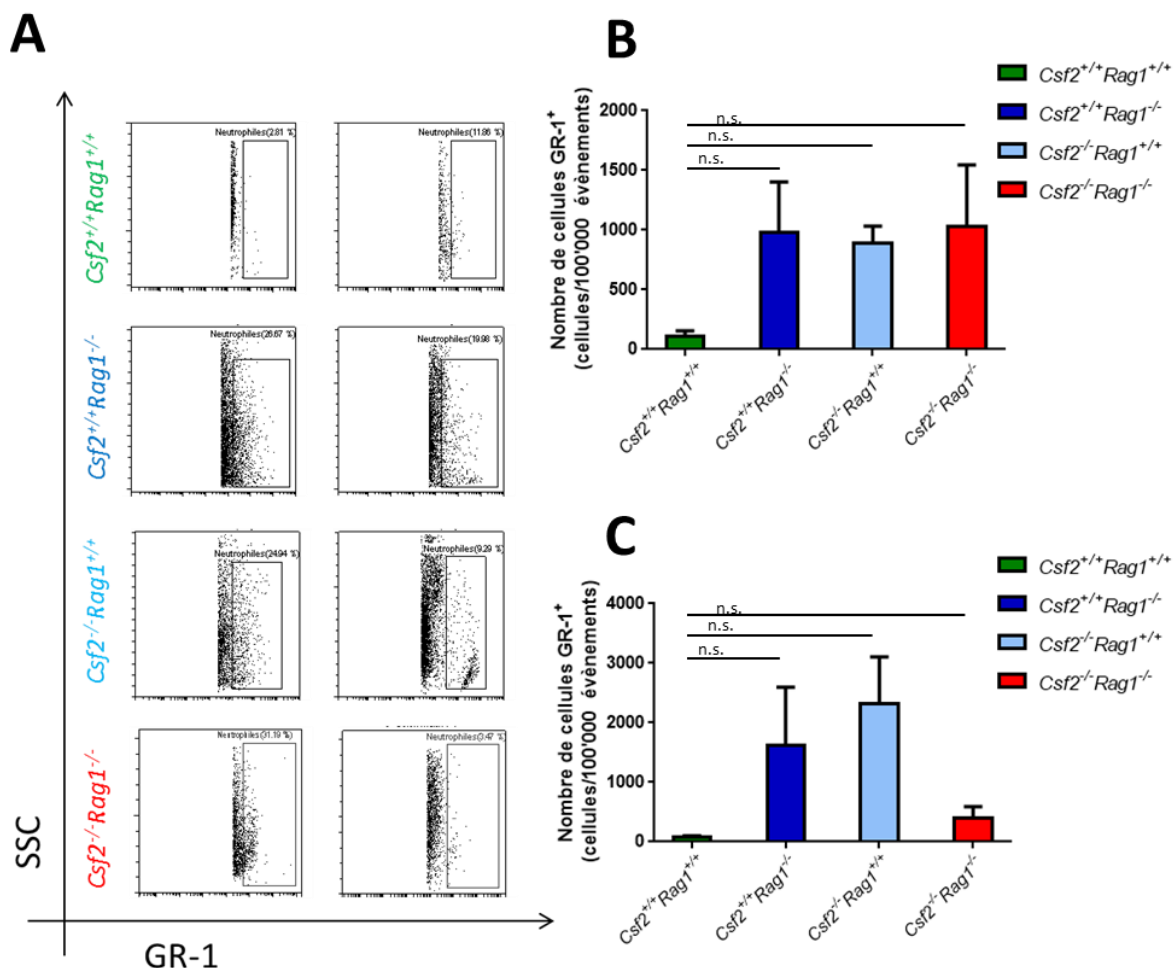


Figure 9 : Évaluation du nombre absolu de neutrophiles intestinales et coloniques des différents génotypes de souris C57BL/6.

A) Résultats visuels représentatifs de cytométrie de flux ajusté à l'affichage des 10⁵ premiers. B) Nombre absolu de neutrophiles pour l'intestin et C) pour le côlon des différents génotypes de souris C57BL/6. Le nombre de cellules pour chaque échantillon a été normalisé à 10⁵. Les résultats sont représentatifs de n>3 souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur.

4.3 Nombre absolu de macrophages intestinaux et coloniques

Pour compléter l'évaluation des populations immunitaires innées, l'évaluation du nombre de macrophages fut également effectuée (**Figure 10A**). Les résultats

d'analyse de l'intestin des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} montre une tendance à avoir plus de cellules F4/80⁺ (respectivement multiplié par un fold de 1.9/ 2.0) par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, alors que le nombre de cellules F4/80⁺ dans les intestins de souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} est similaire à celui observé dans l'intestin de souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 10B**). Ce profil corrobore avec celui des pathologies observées en microscopie, à savoir la présence de lésions intestinales chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} et l'absence de lésions intestinales chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}. Ainsi, le nombre total de macrophages donne indice important sur la nature des lésions intestinales observées.

Dans le colon, le profil des macrophages est similaire à celui observé dans l'intestin (**Figure 10A**). Ainsi, dans le colon, les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont une tendance à avoir plus de cellules F4/80⁺ (respectivement multiplié par un fold de 3.1/ 2.5) par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, alors que le nombre de cellules F4/80⁺ au niveau des colons des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} est similaire à celui observé dans le colon de souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 10C**). Ce profil est en accord avec celui des pathologies observées en microscopie, c'est-à-dire la présence de lésions coloniques chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} et l'absence de lésion chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}. Ainsi, la présence d'une grande quantité de macrophages donne un indice important sur la nature des lésions colonique observées.

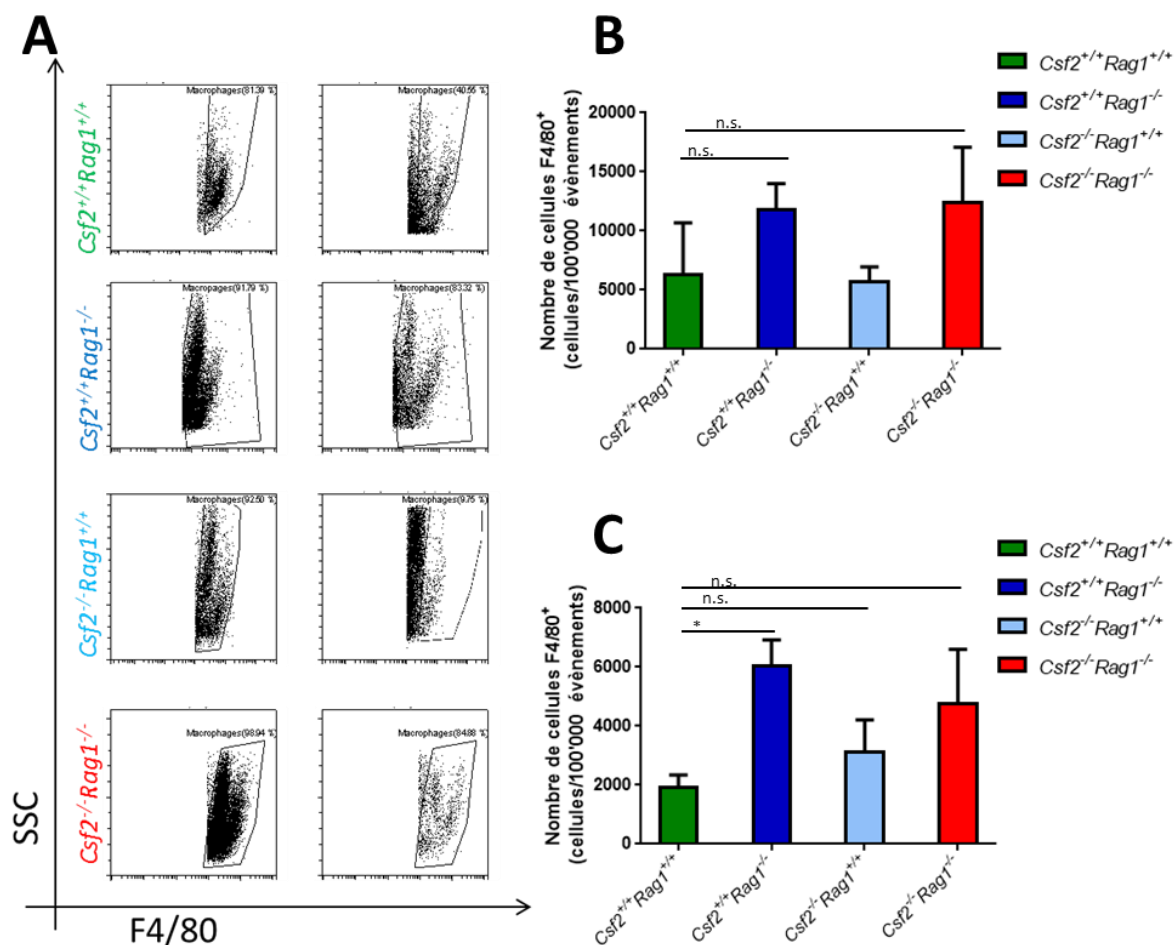


Figure 10 : Évaluation du nombre absolu de macrophages intestinaux et coloniques des différents génotypes de souris C57BL/6 : les souris $Csf2^{+/+} Rag1^{-/-}$ et $Csf2^{-/-} Rag1^{-/-}$ ont significativement plus de macrophages dans l'intestin et le côlon.

A) Résultats visuels représentatifs de cytométrie de flux ajusté à l'affichage des 10^5 premiers événements. B) Nombre absolu de macrophages pour l'intestin et C) pour le côlon des différents génotypes de souris C57BL/6. Le nombre de cellules pour chaque échantillon a été normalisé à 10^5 . Les résultats sont représentatifs de $n > 3$ souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur et où * : $p < 0,05$.

4.4 Étude des populations lymphocytaires intestinales et coloniques

Pour compléter l'impact de la déficience en GM-CSF sur le profil cellulaire immunitaire des lésions observées, nous avons évalué les différentes populations lymphocytaires chez les souris immunocompétents C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{+/+} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/+}.

L'analyse des différentes populations de lymphocytes intestinales (**Figure 11A**), montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les souris C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{+/+} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/+} quant à leur nombre de lymphocytes B (**Figure 11B**) et leur nombre de lymphocytes T CD8⁺ (**Figure 11C**). De façon similaire, aucune différence n'a été observée dans leurs proportions ou leur nombre de sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ (**Figure 11D et Figure 11E**), soit les cellules CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻, CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ et CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Ces résultats excluent la possibilité que les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/+} soient protégées du développement d'inflammation intestinale, observé chez les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}, dû à une variation du nombre de lymphocytes B, T_{CD4+}, T_{CD8+} et T_{reg} intestinal.

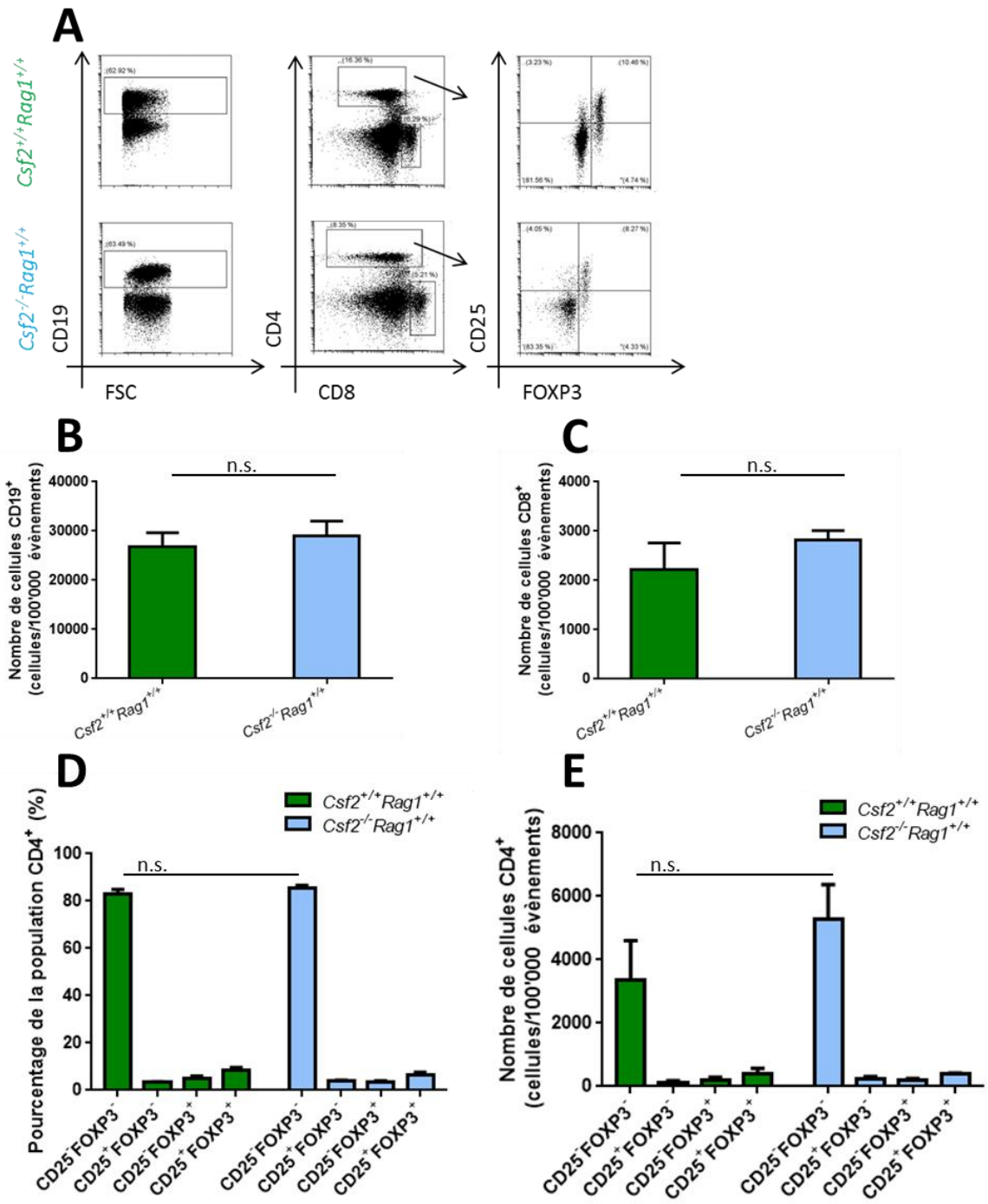


Figure 11 : Évaluation des différentes populations lymphocytaires intestinales des génotypes de souris C57BL/6 immunocompétents.

A) Résultats visuels représentatifs de cytométrie de flux ajusté à l'affichage des 10^5 premiers événements. B) Nombre absolu de cellules CD19⁺ intestinales. C) Nombre absolu de cellules CD8⁺ intestinales. D) Proportions des différentes sous-populations de cellules CD4⁺ intestinales et E) nombre absolu des différentes sous-populations de cellules CD4⁺ intestinales. Les résultats sont représentatifs de n>3 souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de Student non-pairé (pour B et C) et le test de variance d'ANOVA à deux facteurs (Pour D et E). Le nombre de cellules pour chaque échantillon a été normalisé à 10^5 .

L'analyse des différentes populations lymphocytaires coloniques, a montré des résultats similaires à ceux obtenu au niveau de l'intestin. En effet, en mesurant les différentes populations de lymphocytes coloniques (**Figure 10A**), nous n'avons observé aucune différence significative entre les souris C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{+/+} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/+} quant à leur nombre de lymphocytes B (Figure 10B), leur nombre de lymphocytes T CD8⁺(Figure 10C) ou encore leurs proportions ou leur nombre de cellules des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ étudiées (**Figure 10D et 10E**), soit les cellules CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻, CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ et CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Ainsi, ces résultats excluent la possibilité que les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{+/+} soient protégées du développement d'inflammation intestinal, aperçu dans les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}, par une variation de lymphocytes B, T_{CD4+}, T_{CD8+} et T_{reg} colonique.

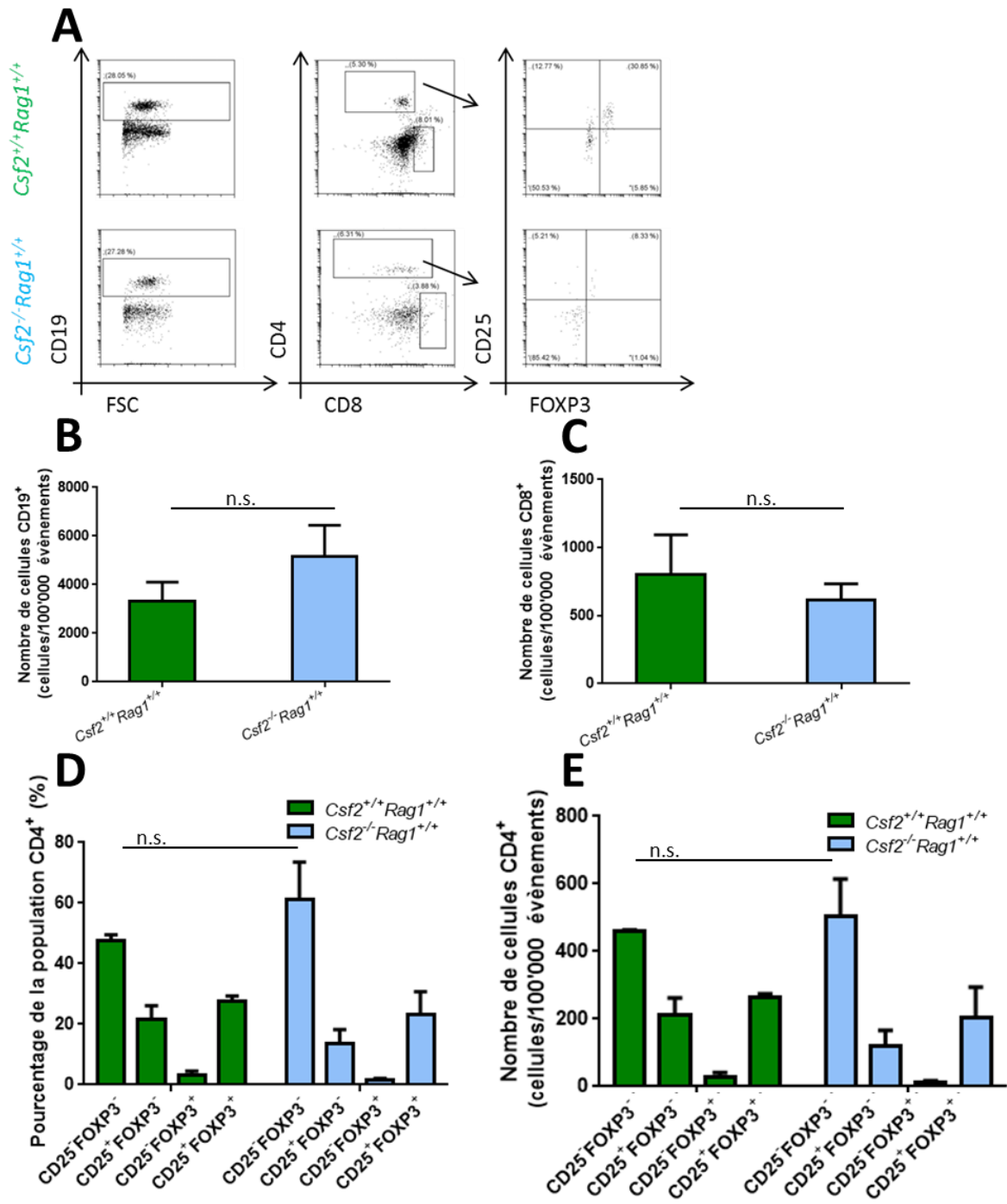


Figure 12 : Évaluation des différentes populations lymphocytaires coloniques des génotypes de souris C57BL/6 immunocompétents.

A) Résultats visuels représentatifs de cytométrie de flux ajusté à l'affichage des $2,0 \cdot 10^4$ premiers événements. B) Nombre absolu de cellules CD19⁺ colonique. C) Nombre absolu de cellules CD8⁺ colonique. D) Proportions des différentes sous-populations de cellules CD4⁺ coloniques et E) nombre absolu des différentes sous-populations de cellules CD4⁺ coloniques. Les résultats sont représentatifs de $n > 3$ souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de Student non-pairé (pour B et C) et le test de variance d'ANOVA à deux facteurs (Pour D et E). Le nombre de cellules pour chaque échantillon a été normalisé à 10^5 .

4.5 Niveaux d'expression de cytokines intestinale

Après avoir détaillé les différentes populations cellulaires, nous nous sommes intéressés à caractériser les niveaux d'expression de gènes de cytokines au niveau intestinale des différents génotypes. Le choix des cytokines observé fut basé sur l'hypothèse de recherche que les DCs sont les cellules causant les lésions perçues. Les cytokines détaillées sont ainsi toutes des cytokines sécrétées par les DCs (Oertli *et al.*, 2012 ; Duan *et al.*, 2012 ; Eken *et al.*, 2014; Fumagalli *et al.*, 2016 ; Besin *et al.*, 2008 ; Yoshida et Hunter, 2015) sélectionnées de façon telle à couvrir les différents types de réponses immunitaires, dont la réponse T_{H1}, la réponse T_{H2} et la réponse T_{H17}. Il y a ainsi l'IL-1 β qui est une cytokine précurseur d'e l'inflammation classique (Boraschi et Tagliabue, 2013), l'IL-18 qui est une cytokine de type T_{H1} (Gracie *et al.*, 2003), l'IL-33 qui est une cytokine maîtresse de la réponse T_{H2} (Villarreal et Weiner, 2014), la TSLP qui est une cytokine maîtresse de la réponse T_{H2} favorisant la promotion d'un phénotype tolérogène chez les DCs (Besin *et al.*, 2008), le TGF- β qui est une cytokine de résolution d'inflammation ainsi que d'induction de lymphocytes T_{reg} ou T_{H17} (Li et Kuemmerle, 2014), l'IL-22 qui est une cytokine sécrétée par les lymphocytes T_{H17} (Eken *et al.*, 2014) et cytokine d'activation épithéliale, la sous unité IL-23p19 qui est un constituant de l'IL-23 qui promeut l'activation des lymphocytes T_{H17} (Eken *et al.*, 2014) et

finalement l'IL-27p28 qui est une sous unité de la cytokine IL-27, cytokine essentielle pour l'inhibition de l'activation des T_{H17} et induisant une modulation du système immunitaire inné (Yoshida et Hunter, 2015).

Dans l'intestin, plusieurs variations du niveau d'expression des cytokines précédemment mentionnées sont notées dépendamment du génotype. En premier lieu, il est à noter l'absence de variation d'expression de l'*Il1b* et de l'*Il18* dans l'intestin des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 13A et Figure 13B**). Les résultats suggèrent que la réponse immunitaire de type T_{H1} n'est pas impliquée dans les lésions intestinales observées.

D'autre part, la réponse de type T_{H2} semble être altérée dans les différents génotypes. Effectivement, tandis que l'expression de l'*Il33* est similaire dans les intestins des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} sont similaires à ceux des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, celle des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} a une tendance à être augmentée (respectivement un fold de 9,70 et 28,05) (**Figure 13C**). Cependant, l'expression du gène *Tslp* chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} est similaires à ceux des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 13D**).

Ainsi, le seul changement significatif d'expression de gènes de cytokines dans l'intestin est parmi les cytokines de type T_{H17}. Alors qu'il n'y a pas de variation d'expression de *Tgfb2* chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 13E**). Il en est autrement pour l'expression des autres cytokines T_{H17} étudiées. Effectivement, tandis que l'expression de l'*Il22* est augmentée dans l'intestin des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} (fold de 9,75) par rapport au aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} se démarquent par une tendance à la baisse d'expression de l'*Il22* (fold de 2,63) (**Figure 13F**). D'autre part, les niveaux d'expression intestinaux d'*IL23A* chez les souris

C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} et les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} sont similaires au niveau d'expression de ce gène dans l'intestin des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 13G**). Finalement, pour compléter l'étude des cytokines de type T_{H17}, les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} ainsi que C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} dénotent une baisse importante d'expression d'*Il27* (respectivement un fold de 2.30, 13.6 et 8,47) par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 13H**).

Ainsi, l'étude de l'expression de gènes des cytokines intestinales n'a pu révéler une polarisation évidente de sécrétion de cytokines. Néanmoins, les souris déficientes en GM-CSF ou en système immunitaire (*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, *Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et *Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}) adaptatives ont une tendance de diminution marquée de l'expression de l'*Il27*.

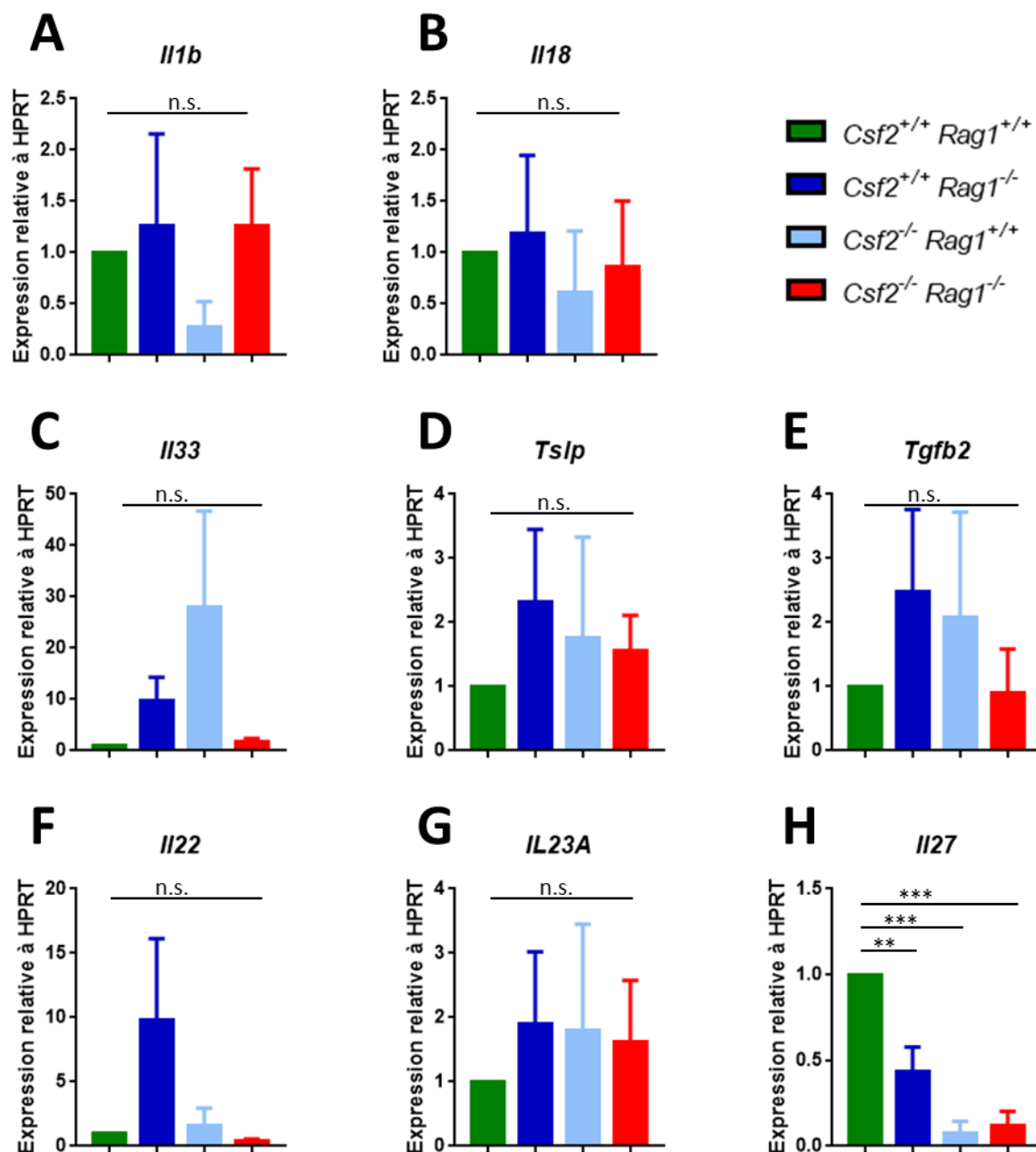


Figure 13 : Évaluation des niveaux d'expression intestinale de différents gènes de cytokines typiquement sécrétées par les DCs des différents génotypes de souris C57BL/6.

Les résultats sont représentatifs de n>3 souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur où ** : p < 0,01 et *** : p < 0,001.

4.6 Niveaux d'expression de cytokines intestinale

Pour ce qui est des niveaux de cytokines des différents génotypes dans le côlon, le profil d'expression de gènes de cytokines diffère. Ainsi, pour les cytokines représentant la réponse T_{H1} , nous n'avons pas observé de différence de l'expression de *Il1b* entre les différents génotypes par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 14A**). De plus, il est à souligner une augmentation de l'expression de *Il18* chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} (fold de 4,05) par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} alors que ceux des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}, ces niveaux d'expression sont similaires (**Figure 14B**). Ainsi, ces résultats suggèrent que, dans le côlon des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} il y a une augmentation de la réponse de type T_{H1} comparativement aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}.

Pour ce qui est des cytokines de type T_{H2} , il est à remarquer en premier lieu une forte hausse d'expression de *Il33* chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} (fold de 33,2) par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, tandis que les niveaux d'*Il33* chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} sont similaires au niveau d'expression retrouvée dans le côlon des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 14C**). De plus, il est à souligner une diminution de l'expression du gène *Tslp* chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} (respectivement un fold de 95,2 et 19,27) ainsi que C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 14D**). Ces résultats suggèrent donc une augmentation de la réponse T_{H2} chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} et une diminution chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}.

De plus, plusieurs changements drastiques sont observés dans l'expression des gènes de cytokines de type T_{H17} . En effet, il est à noter une hausse drastique du *Tgfb2* (fold de 33,2) dans le côlon des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} comparativement aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, tandis que les niveaux d'expression du *Tgfb2* chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}

Rag1^{+/+} sont similaires aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 14E**). De plus, le même profil de différence est observé pour l'expression de l'*IL22*. En effet, il est à noter une forte hausse de l'*IL22* (fold de 72,3) chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} comparativement aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, tandis que les niveaux d'expression de l'*IL22* dans le côlon des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} sont similaires à celui des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 14F**). De plus, il est à souligner l'absence de variation de l'expression de l'*IL23A* dans chez souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} ainsi que C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, bien qu'il y ait une tendance à la baisse chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} (respectivement un fold de 118 et 18,9) (**Figure 14G**). Néanmoins, il est à noter une hausse drastique de l'*IL27* (43,1) chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} comparativement aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, tandis que les niveaux d'expression de l'*IL27* pour les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} sont similaires aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} (**Figure 14H**). Ces résultats suggèrent donc une augmentation drastique de la réponse T_{H17} dans le côlon des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}.

Ainsi, l'étude de l'expression des cytokines coloniques suggère que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} ont une diminution de production de cytokines de type T_{H2} tandis que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont une augmentation de production de cytokines de type T_{H1}, T_{H2} et T_{H17}.

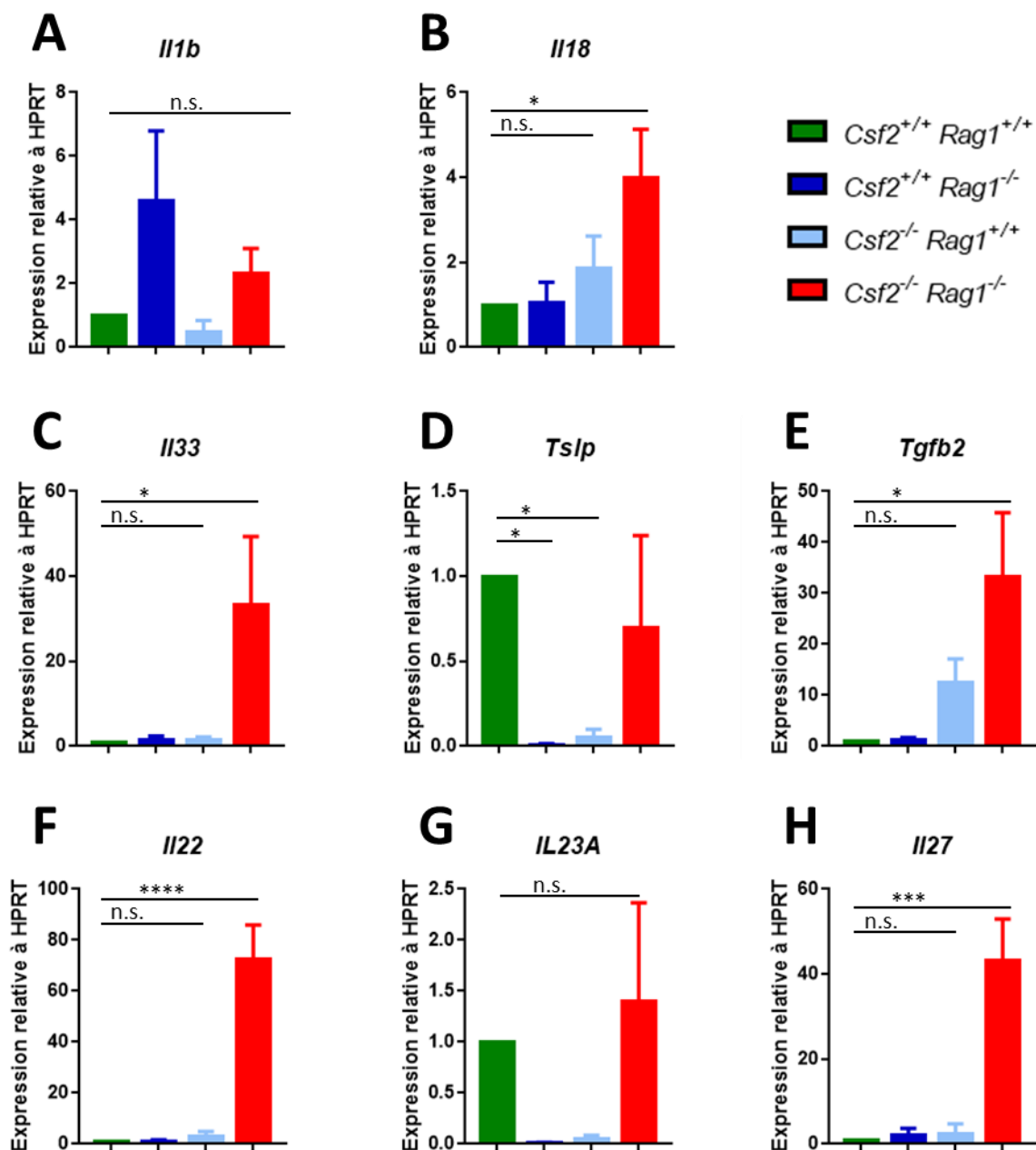


Figure 14 : Évaluation des niveaux d'expression colonique de différents gènes de cytokines typiquement sécrétées par les DCs des différents génotypes de souris C57BL/6.

Les résultats sont représentatifs de n>3 souris par génotype, où les résultats sont exprimés comme étant la moyenne \pm SEM et la signification statistique a été déterminée par le test de variance d'ANOVA à un facteur où * : p < 0,05, ** : p < 0,001 et ****: p < 0,0001.

DISCUSSION

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire de l'intestin idiopathique incurable. En trouver l'étiologie, voire caractériser les mécanismes pathophysiologiques permettrait d'accélérer le développement d'une thérapie curative pour cette pathologie. Étant donné la complexité de la maladie, l'utilisation d'un modèle murin est nécessaire afin de cerner et investiguer les différents facteurs en cause. Bien que plusieurs modèles aient été développés il reste encore plusieurs questions concernant cette pathologie qui n'ont pas de réponse. Ainsi, le développement et la caractérisation d'autres modèles animaux pourraient apporter de nouvelles réponses à ces questions. Dans ce travail nous avons généré un modèle animal ayant une déficience dans le gène codant pour le GM-CSF et/ou RAG-1 que nous avons analysé sur le plan le phénotypique et fonctionnel afin de mieux comprendre l'implication du système immunitaire innée et adaptatif dans le développement spontané des maladies inflammatoires de l'intestin.

En premier lieu, l'étude du gain de poids des souris nous a permis de suspecter une maladie chronique chez les souris déficientes en GM-CSF (C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{+/+}) et/ou en RAG-1 (C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-}). La présence d'une maladie plus grave était suspectée chez les animaux C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-} étant donné que leur survie en général était la plus diminuée. De plus, nos résultats de suivi de poids suggèrent que l'absence du GM-CSF potentialise la maladie retrouvée chez les souris immunodéficientes C57BL/6.RAG-1^{-/-}. Il a été précédemment répertorié que les souris déficientes en GM-CSF ont une susceptibilité colonique accrue à la colite induite au DSS (Xu et al., 2008). En effet, cette sensibilité se traduit par une aggravation des signes d'inflammation, une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une augmentation du nombre de macrophages infiltrant l'intestin (Xu et al., 2008). Ces changements phénotypiques et fonctionnels sont aussi observés chez les souris déficientes en RAG-1 (C57BL/6.RAG-1^{-/-}). En effet, il a été rapporté que ces dernières ont aussi de l'inflammation intestinale

spontanée (Rigoni *et al.*, 2016). Ainsi, nos premiers résultats concordent avec ceux de la littérature et renforce notre hypothèse, stipulant que GM-CSF serait impliqué dans la défense intestinale et jouerait un rôle important plus précisément pour l'homéostasie du système immunitaire inné dans la maladie de Crohn.

Il est bien établi que l'utilisation de l'induction de la colite par le DSS permettrait d'évaluer la résistance intestinale du modèle à l'inflammation intestinale. En effet, dans ce modèle, l'inflammation intestinale générée est contrôlable aussi bien au niveau de son initiation, sa durée que sa sévérité (Perse et Cerar, 2012). Utilisé depuis plus de 20 ans, ce modèle permet de mimer les différents stades de développement des maladies inflammatoires de l'intestin. Toutefois, quelques anicroches sont à noter. Par exemple, l'inflammation ainsi induite se restreint au côlon et est beaucoup plus marqué chez les mâles que les femelles (Chassaing *et al.*, 2015). Néanmoins, induire l'inflammation par le DSS dans notre modèle animal permettrait de réduire la variabilité des données, puisque les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} semblent être sujettes à des épisodes de crises plutôt qu'à une maladie débilitante constante. La colite induite par le DSS dite de type chronique pourra être un modèle intéressant qui nous permettrait de déterminer si la régénération de la barrière épithéliale est affectée par la délétion du GM-CSF (Egea *et al.*, 2013).

Afin d'évaluer la contribution du microbiome aux pertes de poids observées, il est envisageable de ré-effectuer les courbes de poids et de survie en administrant un cocktail d'antibiotiques dirigé vers la flore microbienne des souris. Par cette expérience, il sera possible de déterminer si le microbiome a un rôle dans la formation des lésions intestinales perçus chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. Le rôle de la flore bactérienne dans la maladie de Crohn est une pierre angulaire du développement de l'inflammation intestinale de même que l'importance des bactéries et de leurs métabolites dans l'initiation de la colite induite au DSS ont été démontrés (Hernandez *et al.*, Appleyard, 2003). De plus, le rôle des bactéries dans l'aggravation des symptômes de la colite au DSS a été démontré par l'utilisation d'antibiotiques (Rath *et al.*, 2001). De ce fait, l'utilisation

d'antibiotiques nous permettra de confirmer l'importance du microbiome dans notre modèle animal.

À prime abord, les DCs ne semblent pas être impliqués dans la formation des lésions perçus chez les souris C57BL/6.Csf2^{+/+}Rag1^{-/-} et C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-} étant donné que nous n'avons remarqué que des changements de populations de DCs coloniques chez les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}. En effet, de cette dichotomie de résultat entre l'intestin et le côlon, nous suggérons que cette différence de pathogénèse est due à l'environnement spécifique de ces organes (populations immunitaires, enzymes de digestion, microbiome, etc.), mais qui résulte à la même formation de foyers d'inflammation. Puisque les DCs sont connues pour promouvoir la tolérance immunitaire envers le microbiome par l'action du GM-CSF, l'utilisation du modèle murin cd11c-DTR, nous permettrait de dissocier l'apport du rôle des DCs comparativement aux macrophages dans la gestion de l'inflammation chez les souris déficientes en GM-CSF (Tittel et *al.*, 2012). Le modèle murin cd11c-DTR chez qui le promoteur CD11c se voit exprimer le récepteur à la toxine diphtérique permettant ainsi d'éliminer sélectivement les cellules porteuses du marqueur CD11c suite à l'injection de la toxine diphtérique. Toutefois, il est à noter que ce modèle ne peut être qu'utiliser sur une période d'une semaine dû à l'apparition d'anticorps anti-toxine diphtérique après une semaine (Hochweller et *al.*, 2008), ce qui est désavantageux étant donné que nos résultats suggèrent une pathologie épisodique chronique c'est à dire à long terme. Néanmoins, si ce modèle est couplé à la technique d'induction de la colite aigue au DSS, les résultats seraient très pertinents quant à la compréhension de l'implication des DCs dans les pathologies aperçues. Dans cette optique il a précédemment été démontré que les DCs CD103⁺CD11b⁻ sont impliqués dans la diminution de la réponse inflammatoire dans la colite induite au DSS (Muzaki et *al.*, 2016). Ainsi, il est possible qu'augmenter les concentrations de GM-CSF dans notre modèle animal serait très utile quant à déterminer si les effets observés sont dû à un problème développemental et déterminer le potentiel prophylatique, thérapeutique et réparateur du GM-CSF quant à la gestion de l'inflammation

intestinale. En effet, le GM-CSF a précédemment démontré un potentiel thérapeutique pour la maladie de Crohn (Egea *et al.*, 2010). Ainsi, l'injection du GM-CSF, avant, pendant ou après le développement d'inflammation intestinale pourraient être une approche thérapeutique très intéressante. De même, l'utilisation d'un modèle animal surexprimant le GM-CSF pourrait être très intéressante comme approche alternative aux injections de GM-CSF.

Nos résultats montrant la présence de foyers inflammatoires au niveau de l'intestin et du colon suggèrent qu'il pourrait avoir des effets néfastes sur la perméabilité de la barrière intestinale. Ainsi, l'évaluation de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale par une technique précédemment établie (Volynets *et al.*, 2016) contribuera à déterminer si l'intégrité de la barrière épithéliale est affectée par la délétion du GM-CSF. En effet, l'apparition de lésions intestinales chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} suggère une augmentation de la perméabilité de l'intestin, cette dernière étant une marque distinctive de la maladie de Crohn (Schwender *et al.*, 2014).

L'analyse des infiltrats inflammatoires intestinaux des souris déficientes en GM-CSF ont révélé des résultats surprenants. En effet, nous avons observé des infiltrats inflammatoires chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} alors que nous attendions à voir des signes d'inflammation intestinale chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} étant donné que ces deux derniers génotypes présentaient des signes de maladies. De plus, étant donné que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} sont connues comme ayant des susceptibilités à l'inflammation intestinale (Maloy, 2007 ; Xu *et al.*, 2008), ce fut à notre surprise que nous n'avons pas observés d'infiltrats inflammatoires intestinaux chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}. Ainsi, à cette étape, alors qu'il était fort peu probable que les souris lesquelles soient atteintes d'une inflammation intestinale, elles étaient vraisemblablement atteintes d'épisodes de maladies périodiques étant la présence de signes de maladies et l'absence de signes d'inflammation intestinales.

Pour avoir l'évaluation phénotypique complète des souris de différents génotypes, il serait pertinent d'effectuer des tests comportementaux, entre autre dû au fait qu'il a été rapporté que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} d'avoir une libido diminuée suggérant de potentiel trouble comportementaux (Seymour et *al.*, 1997). D'ailleurs, quelques cas de souris ayant des paralysies et des hydrocéphalies ont été notés sur la période de l'étude (résultats non-présentés). D'ailleurs, il a été rapporté que le GM-CSF serait impliqué dans la sévérité des symptômes de l'encéphalite induite (McWilliams et *al.*, 2015), suggérant une possible atteinte cérébrale chez les souris déficientes en GM-CSF.

Nos résultats d'analyse de l'histologie de l'intestin et du côlon des souris de différents génotypes ont montré une absence d'inflammation intestinale chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} suggérant que le GM-CSF ne promeut pas une protection contre les maladies inflammatoires intestinales. De plus, les résultats obtenus ne concordent pas avec les précédents résultats phénotypiques, à savoir qu'un gain de poids diminué chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} alors que des lésions intestinales et coloniques ne furent notées que chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. Ces différences pourraient être expliquées par le fait que les souris auraient été euthanasiées dans une période récupération, bien que cette possibilité soit peu probable étant donné le nombre de répliques. Cette discordance entre le profil de perte de poids et celui des résultats de l'examen histologique, nous permet de suspecter au moins deux mécanismes de pathologies différents entre les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. D'un autre côté, le fait que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} ont des lésions plus étendues que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, suggère que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} auraient une forte susceptibilité à l'inflammation intestinale. Ainsi, il est attendu que les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} aient une très grande susceptibilité à la colite induite par le DSS comparativement aux souris contrôles compétentes en GM-CSF.

Après avoir démontré que les souris déficientes en GM-CSF étaient atteintes d'une maladie chronique épisodique et la présence également d'anomalies intestinales chez les souris déficiente en RAG-1, il était important de déterminer l'implication des facteurs environnementaux. Ainsi, l'étude du gain de poids et de la survie des souris maintenues dans l'animalerie sans pathogènes nous a indiqué que les pathogènes ne pourraient pas être considérés dans l'étude et peuvent fausser les études effectuées dans une animalerie conventionnelle.

Bien que les résultats obtenus en animalerie sans pathogènes soient similaires à ceux obtenus dans l'animalerie conventionnelle, les dissonants entre les résultats des courbes de gains de poids indiquent que seules les souris femelles C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} sont en moyenne plus grosses que les souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+}, suggérant que le microbiome pourrait avoir une influence sur le rôle du GM-CSF dans le contexte intestinal via le système endocrinien par les hormones féminines (oestrogène, progestérone, etc.). Réaliser les courbes de gains de poids des souris avec un cocktail d'antibiotiques nous permettra de confirmer l'influence du microbiome sur le rôle du GM-CSF via le système endocrinien. De plus, étant donné ces différences de gain de poids et du fait que la différence d'intensité de réponse à la colite induite au DSS est plus intense chez les mâles que les femelles (Chassaing et *al.*, 2015), il serait avantageux de prendre en compte le sexe des souris afin de réduire les variations de résultats qui seraient influencés par ce paramètre.

Une autre explication possible de la perte de poids chez les souris déficientes en GM-CSF est la présence possible des anomalies pulmonaires précédemment répertoriés chez ces souris. Dranoff et collaborateurs ont rapporté que ces anomalies pulmonaires sont caractérisées par une protéinose alvéolaire idiopathique, une accumulation de macrophages et une hyperplasie lymphoïde autour des veines et des alvéoles (Dranoff et *al.*, 1994). Tel qu'attendu, nous avons donc observé des lésions pulmonaires uniquement chez les souris

déficiences en GM-CSF. Ces lésions pulmonaires ne peuvent pas expliquer l'attribution de la cyclicité de la maladie, puisque la maladie pulmonaire est de type chronique continue (Nakata et *al.*, 2006) ce qui ne correspond pas au scénario de perte de poids épisodique tel que observé chez les souris déficientes en GM-CSF.

Tout comme pour l'intestin, il serait important de déterminer la nature des lésions pulmonaires par immunohistochimie et de faire évaluer les coupes histopathologies observées par un pathologiste expert.

Dans ce travail, nous nous sommes également intéressé à caractériser les populations cellulaires immunitaires de l'intestin et du côlon afin de déterminer les mécanismes à l'origine des pathologies observées chez le souris déficientes en GM-CSF. Étant donné leur rôle pivot dans l'initiation de l'inflammation, nous nous sommes intéressés en premier lieu à caractériser les différentes sous-populations de DCs. En effet, dans le cas des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}, la population de DCs augmentée est celle des DCs tolérogènes et ce seulement dans l'intestin. Ceci suggère donc que le GM-CSF promeut un phénotype immunogène des DCs et que leur diminution pourrait induire l'inflammation intestinale. Il a aussi été précédemment montré que l'élimination de l'ensemble des cellules CD11c positive aggrave les symptômes de la colite induite au DSS, suggérant donc un rôle important des DCs dans l'inflammation intestinale (Berndt et *al.*, 2007). Ainsi, on peut stipuler que si les DCs sont impliqués dans les lésions intestinales et coloniques perçues, ce serait plutôt relié à une altération de leurs fonctions. Ainsi, il reste à étudier par cytométrie les marqueurs de fonctionnalité des différentes populations de DCs intestinales ainsi qu'à effectuer les tests fonctionnels associés à ces sous-populations DCs, c'est-à-dire leur capacité de phagocytose et d'activation des cellules T.

La seconde population cellulaire qui fut étudiée est celle des neutrophiles. Les neutrophiles sont des cellules très mobiles ayant la capacité de phagocytose, de tuer et de digérer les micro-organismes envahisseurs. Les neutrophiles sont aussi

les cellules les plus abondantes du système immunitaire et ont un rôle important dans l'initiation, la prolongation ainsi que les dommages subséquent à l'inflammation prolongée (Aydemir et *al.*, 2016). Au moment de la rédaction de ce mémoire, le rôle des neutrophiles dans la maladie de Crohn est encore incertain. D'un côté, la clairance bactérienne et le recrutement des neutrophiles *in vivo* est moindre chez les patients atteints de la maladie de Crohn comparativement aux participants sains (Levine et Segal, 2013). De plus, les neutrophiles circulants des patients atteints de la maladie de Crohn exhibent des signes d'activations (Aydemir et *al.*, 2016). Ces données suggèrent une anomalie fonctionnelle chez les neutrophiles des patients atteints de la maladie de Crohn. Cependant, il a été rapporté que les capacités de chimiotaxie, de phagocytose et de digestion *in vitro* des neutrophiles des patients atteints de la maladie de Crohn sont normales (Levine et Segal, 2013 ; Hayee et *al.*, 2011) et que les patients atteints de la maladie de Crohn ont un ratio neutrophiles/lymphocytes sanguin plus élevé que chez les patients contrôles (Gao et *al.*, 2015).

Nos résultats, montrent que les trois génotypes murins mutants (C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{+/+}, C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-}) ont une tendance à avoir un nombre plus élevé de neutrophiles que les souris de type contrôles C57BL/6.*Csf2*^{+/+} *Rag1*^{+/+}. Étant donné l'ampleur des lésions et la dégradation des tissus environnants chez les souris mutantes, nous suspectons l'implication des neutrophiles dans le système. Néanmoins étant donné que le GM-CSF a un rôle puissant sur l'activation des neutrophiles, il serait nécessaire d'étudier les sous-populations de neutrophiles, ainsi que la présence de marqueurs d'activation et enfin, leurs fonctions comme la réponse à la chimiotaxie, la phagocytose, la flambée oxydatif, l'élimination des bactéries.

Pour compléter l'étude des populations cellulaires innées, nous avons déterminé le nombre de macrophages intestinaux. Depuis les années 70, un défaut associé aux macrophages est soupçonné d'être une cause immunologique de la maladie de Crohn. En effet, ayant une capacité phagocytaire élevée (Caprilli et Frierri, 2009) et

un grand potentiel de présentation antigénique (Hume, 2008), les macrophages sont un hybride fonctionnel entre les neutrophiles et les DCs. Les macrophages composent une partie des granulomes inflammatoires aperçus dans la maladie de Crohn (Caprilli et Frierri, 2009). De plus, il a été montré que les macrophages des patients atteints de la maladie de Crohn ont un défaut dans la clairance bactérienne, et ce malgré des capacités de phagocytose et de flambée oxydative normale (Elliot et *al.*, 2015). De plus, Il a été démontré que les macrophages des patients atteints de la maladie de Crohn ont une diminution de sécrétion de cytokines pro-inflammatoire suite à une stimulation *in vitro* (Casanova et Abel, 2009).

Ainsi, dans les deux génotypes murins déficients en RAG1 (C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}), nous avons pu observer une tendance à la hausse du nombre de macrophages aussi bien dans l'intestin que dans le côlon. De façon surprenante, nous n'avons pas observé une hausse du nombre de macrophage dans le côlon des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}, tel que reporté ultérieurement (Morthas et *al.*, 2014). D'autre part, étant donné que les lésions intestinales et coloniques étaient restreintes aux souris C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}, nous nous attendons à n'avoir des hausses du nombre de macrophage que dans ces génotypes. Tout comme les DCs, l'activité des macrophages est aussi affectée par le GM-CSF. Ainsi, il serait intéressant d'étudier les marqueurs d'activation des macrophages intestinaux, d'en décortiquer les sous-populations et finalement d'en étudier leurs fonctionnalités.

Finalement, afin de tracer un portrait complet du système immunitaire, nous avons effectué le profil des lymphocytes des souris immunocompétentes C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}. Une étude récente a montré que les patients atteints de la maladie de Crohn ont un influx massif de lymphocytes B et T vers les zones intestinales affectées (Eksteen et *al.*, 2008). Ce recrutement au niveau de l'intestin fait suite à la sécrétion de CCL25 en induisant l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ après la liaison au récepteur CCR9 (Monteleone et

al., 2011). De cette façon, les lymphocytes ont accès aux différents compartiments de l'intestin et sont activés par l'environnement inflammatoire propice. De plus, dans la maladie de Crohn, la capacité d'engendrer des zones inflammations extra-intestinales ont été suggérées être associées à l'activation massive des lymphocytes T (Eksteen et *al.*, 2008). Dans ce travail, nous n'avons observé aucune différence significative aussi bien dans les populations de lymphocytes B, T CD4+, T CD8+ ou encore dans les populations de lymphocytes T régulateurs. Étant donné que nous n'avons pas observés de pathologies intestinales et coloniques chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+}, il nous fut surprenant de ne pas observer de changements des populations lymphocytaires régulateurs, ce qui aurait pu être un phénomène compensateur de l'absence du GM-CSF puisque on avait montré une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs par l'injection de GM-CSF chez la souris NOD (Gaudreau et *al.*, 2007).

Afin d'explorer les mécanismes sous-jacents aux pathologies observées, nous avons analysé l'expression des gènes des cytokines intestinales et coloniques. Étant donné l'importance des DCs dans la polarisation de la réponse immunitaire, nous avons choisi d'étudier le profil de gènes de cytokines sécrétées par les DCs. Ainsi, de façon étonnante, aucune tendance de polarisation de réponse immunitaire n'a été dénotée par l'étude de l'expression de gènes de cytokines au niveau intestinal. De plus, aucune différence d'expression ne fut notée pour les gènes des cytokines T_{H1} IL-1 β et IL-18. D'autre part, une augmentation de l'expression du gène de la cytokine T_{H2} IL-33 est aperçue dans l'intestin des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/-}*Rag1*^{-/-} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/-}. Finalement, une augmentation de l'expression du gène de la cytokine T_{H17} IL-22 dans l'intestin des souris C57BL/6.*Csf2*^{+/-}*Rag1*^{-/-} est notée, alors qu'une diminution de l'expression du gène de l'IL-22 est constatée dans l'intestin des souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. Étant donné l'ampleur des lésions intestinales, le manque flagrant de polarisation de réponse immune T_{H1}, T_{H2} ou T_{H17} n'exclue pas que ces cytokines pourraient être associées aux lésions puisque la polarisation immune vers une réponse T_{H1} est en outre caractérisée par la hausse de l'expression des gènes des cytokines IFN γ , TNF- α ,

IL-2, IL-12 et constituent des marqueurs de la maladie de Crohn, tout comme les cytokines T_{H2} IL-4, IL-6, IL-13 et T_{H17} IL-17, IL-21, IL-22, et IL-23 (Múzes, 2012).

Néanmoins, dans l'intestin, une diminution notable de l'expression du gène codant pour l'IL-27 est observée dans les trois différents génotypes C57BL/6.*Csf2*^{+/+}*Rag1*^{-/-}, C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{+/+} et C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} par rapport au type sauvage. L'IL-27 est impliquée dans l'activation du système immunitaire inné, la survie des lymphocytes T régulateur et l'induction de lymphocytes TH_{17} (Meka et al., 2016). Dans les phases actives de la maladie de Crohn, la concentration d'IL-27 est augmentée dans les zones inflammées (Xu et al., 2014). Bien que l'IL-27 soit clairement impliquée dans la modulation de l'inflammation intestinale, la littérature est mitigée quant à savoir si son implication bénéfique ou délétère. En effet, il a été montré que, dans le cas de colite induite au DSS et au «2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid» (TNBS), l'injection d'IL-27 protège contre l'inflammation (Hanson et al., 2014 ; Sasaoka et al., 2011). De même, lors de l'induction d'une entérocrite par le transfert adaptatif de cellules T $CD4^+CD45^{RBélévé}$ chez des souris receveuses *Rag1*^{-/-}, le gavage de *Lactococcus lactis* génétiquement modifié à sécréter de l'IL-27 recombinant protège contre l'inflammation par la production d'IL-10 par les lymphocytes T mucosaux (Hanson et al., 2014). D'autre part, la délétion de la sous-unité α du récepteur à l'IL-27 (IL-27R α ^{-/-}) a permis de montrer des résultats qui sont aussi bénéfiques en diminuant le nombre et l'efficacité de sécrétion de cytokines proinflammatoires par les lymphocytes NKT dans le modèle d'inflammation induite à l'oxalozone (Neurath et al., 1995; Nieuwenhuis et al., 2002). De plus, la colite induite chez les souris IL-27R α ^{-/-} par injection d'une haute concentration de DSS est plus sévère et est associée à une réponse T_{H17} augmentée (Troy et al., 2009). Néanmoins, de façon contradictoire, il a aussi été montré que la délétion du récepteur IL-27R α ne change pas la course de la colite induite au TNBS (Nieuwenhuis et al., 2002). De plus, les souris IL-27R α ^{-/-} soumises à une colite induite par une faible concentration de DSS sont protégées contre l'inflammation. Ce phénomène est accompagné par une diminution de cytokines pro-inflammatoires (Honda et al.,

2005) et est suggéré d'être dû au fait que l'IL-27 inhibe la production d'IL-17 qui, à faible concentration de DSS, a un rôle protecteur en renforçant les défenses de la barrière épithéliale et limite les dégâts tissulaires (Hunter et Kastelein, 2012). Dans un même ordre d'idée, la délétion de l'IL-27R α chez les souris déficientes en IL-10 retarde l'apparition de la colite spontanée (Villarino *et al.*, 2008) alors que les souris déficientes en IL-27 sont plus susceptibles à la colite induite au TNBS (Neurath *et al.*, 1995). Enfin, le transfert de cellules T IL-27R $\alpha^{+/+}$ à des souris receveuses TCR $\beta^{-/-}$ promeut un développement sévère de la colite médiée par les lymphocytes T de type T_{H17} alors que les souris receveuses TCR $\beta^{-/-}$ chez qui on a fait un transfert de cellules T IL-27R $\alpha^{-/-}$ sont protégées (Visperas *et al.*, 2014).

En ce qui concerne les niveaux d'expression de cytokines dans le côlon, nous avons pu remarquer des différences beaucoup plus marquées au niveau des intestins des souris C57.BL/6.Csf2 $^{-/-}$ Rag1 $^{-/-}$ par rapport aux autres souches de souris. Nous avons noté une augmentation drastique des gènes de l'IL-18, l'IL-33, le TGF- β , l'IL-22 et l'IL-27. De façon contrastée, nous avons observé une baisse de l'expression de la TSLP qui promeut la réponse inflammatoire T_{H2} chez les souris C57BL/6.Csf2 $^{+/+}$ Rag1 $^{-/-}$ et une baisse de l'expression de la cytokine IL-23 qui promeut la réponse T_{H17} chez les souris C57BL/6.Csf2 $^{+/+}$ Rag1 $^{-/-}$ et C57BL/6.Csf2 $^{-/-}$ Rag1 $^{+/+}$. Ainsi, il est possible que les pathologies observées au niveau du colon des différents génotypes impliquent des mécanismes physiopathologiques différents.

L'IL-18 a un rôle important dans l'inflammasome et a conséquemment un rôle pro-inflammatoire et diverses actions sur les cellules immunitaires et somatiques (Opipari et Franchi, 2015). L'IL-18 est sécrétée par la majorité des cellules du corps, mais les cellules qui en sécrètent le plus sont les macrophages et les DCs (Novick *et al.*, 2013). De plus, dans la maladie de Crohn, une élévation de la sécrétion de l'IL-18 a été répertoriée par rapport aux participants sains (Opipari et Franchi, 2015).

L'IL-33 ne semble pas être impliqué dans la pathophysiologie de la maladie de Crohn. En effet, l'expression de l'IL-33 n'est pas augmentée chez les patients atteints de la maladie de Crohn et aucun SNP n'a été corrélé avec la maladie (Seidelin et *al.*, 2011). Néanmoins, l'IL-33 est considérée comme un signal potentiel de danger, c'est à dire une alarmine principalement sécrétée lors du dommage des cellules épithéliales, pouvant enclencher une forte réponse immunitaire de type T_H2 (Martin, 2013) et possiblement recruter les neutrophiles (García-Miguel et *al.*, 2012). De plus, l'IL-33 est en mesure d'induire la génération de DCs via l'induction de production du GM-CSF (Mayuzumi et *al.*, 2009) et ainsi diminuer le seuil de susceptibilité aux antigènes exogènes (Llop-Guevara et *al.*, 2014). En accord avec ces données, nos résultats montrent une augmentation draconienne des niveaux d'expression d'IL-33 chez les souris C57.BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-} suggérant donc que des lésions importantes de la barrière épithéliale seraient à l'origine des pathologies observées.

L'augmentation du gène *Tgfb2* pourrait, signifier une résolution de l'inflammation, une réparation tissulaire ou encore l'induction des processus de fibrose tel que observées dans la maladie de Crohn (Li et Kuemmerle, 2014). En effet, la sténose dû à l'implication de la fibrose intestinale et l'augmentation de l'expression du TGF- β est souvent observée parmi les patients atteints de la maladie de Crohn (Biancheri et *al.*, 2013). Ainsi, l'augmentation de TGF- β dans nos études suggèrerait que des processus de cicatrisations sont en cours chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-} pour contrer le développement de l'inflammation intestinale.

Dans le même ordre d'idée, l'IL-22 est une cytokine de la famille de l'IL-10 (Roberts-Thomson et *al.*, 2014). L'IL-22 est sécrétée par les lymphocytes T_H17 , les ILC3 et les neutrophiles et ses effets sont principalement médiés par les cellules épithéliales, dont celles de l'intestin (Eken et *al.*, 2014). L'IL-22 induit notamment la production des peptides anti-microbiens et la mobilité épithéliale, étant ainsi impliquée dans les phénomènes de défense immunitaire innée et la réparation des lésions intestinales (Brand et *al.*, 2006). Cette cytokine est entre autre présente en

forte concentration dans les lésions des patients atteints de la maladie de Crohn (Eken et *al.*, 2014). Chez la souris, l'injection d'IL-22 diminue les symptômes de colite induite au DSS (Strober et Fuss, 2011), et sa neutralisation aggrave ceux-ci (Eken et *al.*, 2014). Nos résultats montrant une augmentation excessive des niveaux d'expression d'IL-22 intestinal chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} conforte encore l'idée que la barrière épithéliale de ces souris a subi des lésions importantes.

Comme mentionné précédemment, l'augmentation d'expression de l'IL-27 révèle une forte modulation du système immunitaire innée chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. L'IL-27 est entre autre associée à une diminution de l'expression des cytokines T_{H17} par le blocage de l'expression de ROR γ t et favorise la sécrétion d'IL-10 (Hunter et Kastelein, 2012). L'augmentation de la sécrétion d'IL-27 chez les souris C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-} suggère une augmentation des phénomènes tolérogènes allant ainsi dans le sens de l'hypothèse de recherche qui stipule que le GM-CSF promeut la tolérance immunitaire intestinale envers le microbiome par la promotion du phénotype tolérogène des DCs.

Pour compléter l'étude des cytokines intestinales et coloniques, il serait important de déterminer les niveaux d'expression des autres cytokines exprimées par les DCs, de confirmer l'expression des niveaux des cytokines par ELISA et de déterminer l'origine cellulaire de sécrétion les cytokines par cytométrie de flux.

En résumé, l'absence du GM-CSF semble potentialiser les pathologies aperçus dans les intestins des souris immunodéficientes C57BL/6.*Csf2*^{-/-}*Rag1*^{-/-}. De ces travaux il ressort aussi que le GM-CSF est une cytokine modulant de façon générale le système immunitaire inné sans trop affecter directement le système immunitaire adaptatif. En effet, plusieurs études suggèrent que la maladie de Crohn serait une maladie d'immunodéficiência primaire (Yamamoto-Furusho et Korzenki, 2006 ; Vinh et Berh, 2015). Toutefois, étant donné les effets pléiotropies,

la spécificité pour son récepteur et la régulation non-orthodoxe du GM-CSF, un traitement par le GM-CSF pourrait être envisageable.

CONCLUSION

En conclusion, la maladie de Crohn est une maladie dont les mécanismes immunologiques fondamentaux impliqués ne sont pas encore complètement compris. De ce fait, ces travaux de recherche, ont mis en lumière l'importance biologique du GM-CSF dans la compréhension de la physiologie de cette pathologie intestinale. Brièvement, ce travail a consisté en l'évaluation des conséquences de la déficience en GM-CSF chez des souris immunocompétentes et des souris immunodéficientes sur le système immunitaire adaptatif et inné respectivement, ainsi que l'évaluation de l'intégrité physiologique des organes d'intérêt, l'évaluation des facteurs de confusion les plus probants et des mécanismes physiopathologiques impliqués. Nous avons montré que des changements dans les populations cellulaires, telles que les DCs, les macrophages et les neutrophiles se produisent en absence du GM-CSF et que ces changements sont beaucoup marqués en l'absence du système immunitaire adaptatif. Ces changements sont aussi accompagnés de très grande augmentation de production de cytokines proinflammatoires dans le côlon des souris C57BL/6.*Csf2^{-/-}Rag1^{-/-}*.

Mot de la fin : forces et faiblesses du projet

Comme tout modèle scientifique, ce modèle a ses forces et ses faiblesses. Étant donné le peu de connaissances fondamentales sur le sujet, le projet peut conséquemment déboucher très rapidement sur des résultats au potentiel cliniques intéressants. Étant donné la complexité du contexte des pathologies intestinales, l'utilisation d'un modèle déficient en système immunitaire adaptatif (*Rag-1^{-/-}*) nous permet d'isoler et de caractériser le rôle du système immunitaire inné. Selon nos résultats, la délétion d'une unique cytokine, le GM-CSF, a des répercussions immunitaires intestinales et coloniques majeures. De plus, l'utilisation d'un modèle murin KO permet d'avoir des résultats clairs quant au rôle du GM-CSF dans l'inflammation intestinale innée et adaptative et d'effectuer un grand nombre de type d'expériences. De plus, puisque le GM-CSF et sa

signalisation agissent sur un faible nombre de type de cellules, cela restreint le temps associé aux études exploratoires. Au revers de la médaille, il est à noter que le modèle nécessite quelques ajustements afin d'optimiser l'efficacité du travail dont notamment le rendement d'extraction de cellules immunitaires intestinales et coloniques ainsi qu'optimiser l'exclusion des débris suite à la digestion enzymatique. De plus, les colorations hématoxylines/éosines des coupes sont substandards ; pour une publication, il serait nécessaire de les réeffectuer afin que la couleur des noyaux nucléaires soient plus prononcées et la couleur des cytoplasmes. Finalement, malgré des similarités frappantes avec la maladie de Crohn, dont la chronicité, la cyclicité et les zones d'inflammation dispersées en foyers transmuraux le long du tractus intestinal, nous n'avons pas l'audace de clamer que nous avons recréé un modèle murin atteint la maladie de Crohn. Ces travaux ont servi à établir les bases d'un nouveau modèle d'inflammation intestinale spontanée à la suite de la délétion d'une unique cytokine, cytokine ayant un potentiel thérapeutique précédemment prouvé en études cliniques. Nous pensons néanmoins que les aboutissements qui découleront de ce projet permettront d'améliorer la compréhension de la maladie de Crohn et d'aboutir à la découverte de pistes de recherche pour l'élaboration traitements curatifs pour la maladie de Crohn.

LISTE DES REFERENCES

Aagaard K., Ma J., Antony K M., Ganu R., Pestrosino., Versalovic J., (2014), The Placenta Harbors a Unique Microbiome, *Science Translational Medicine*, May 21; 6(237): 237

Alang N., Kelly C R., (2015), Weight Gain After Fecal Microbiota Transplantation, *Open Forum Infectious Diseases*, DOI: 10.1093/ofid/ofv004

Artis D., Spits H., (2015), The biology of innate lymphoid cells, *Nature*, January 15;517(7534):293-301

Aydemir Y., Pinar A., Hizal G., Demir H., Temizel I N S., Ozen H., Akbiyik F., Yuce A., (2016), Neutrophil volume distribution width as a new marker in detecting inflammatory bowel disease activation, *International journal of laboratory hematology*, doi:10.1111/ijlh.12574

Besin G., Gaudreau S., Ménard M., Guindi C., Dupuis G., Amrani A., (2008), Thymic Stromal Lymphopoietin and Thymic Stromal Lymphopoietin–Conditioned Dendritic Cells Induce Regulatory T-Cell Differentiation and Protection of NOD Mice Against Diabetes, *Diabetes*, volume 57, p.2107-2117

Bewrnt B E., Zhang M., Chen G H., Huffnagle G B., Kao J Y., (2007), The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis, *journal of immunology*, volume 179, p.6255-6262

Bhattacharya P., Thiruppathi M., Elshabrawy H A., Alharshaw K., Kumar P., Orabhakar B S., (2015), GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity, *Cytokine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.030>

Biancheri P., Guiffida P., Docena G H., Macdonald T T., Corazza G R., Di Sabatino A., (2013), The role of transforming growth factor (TGF)- b in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut, *Cytokines & growth factors reviews*, volume 25, p.45-55

Boraschi D., Tagliabue A., (2013), The interleukin-1 receptor family, *Seminars in Immunology*, volume 25, p. 394-407

Brand S., Beigel F., Olszak T., Zitzmann K., Eichhorst S T., Otte J M., Diepolder H., Marquardt A., Jagla W., Popp A., Leclair S., Herrmann K., Seiderer J., Ocsenkuhn T., Goke B., Auernhammer C J., Dambacher J., (2005), IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, volume 290, p.827-838

Braniste V., Al-Amakh M., Kowal C., Anuar F., Abbaspour A., Toth M., Korecka A., Bakocevic N., Ng L G., Kundu P., Gulays B., Halldin C., Hultenby K., Nilsson H., Hebert H., Volpe B T., Diamond B., Pettersson S., (2014), The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice, *Science Translational Medicine*, November 19; 6(263)

Braniste V., Al-Asmakh M., Kowal C., Anuar F., Abbaspour A., Toth M., Korecka., Bakocevic N., Ng L G., Kundu P., Halldin C., Hultenby K., Nilsson H., Hebert H., Volpe B T., Diamond B., Pettersson S., (2014), The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice, *Science Translational Medicine*, November 19; 6(263): 263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759

Broughton S E., Dhagat U., Hercus T R., Nero T L., Grimbaldston M A., Bonder C S., Lopez A F., Parker M W., (2012), The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling, *Immunological Reviews*, Vol. 250: 277–302

Bruhs A., Haarmaan-Stemmann T., Frauenstein K., Krutmann J., Schwarz T., Schawrz A., (2015), Activation of the Arylhydrocarbon Receptor Causes Immunosuppression Primarily by Modulating Dendritic Cells, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 135

Buela K A G., Omenetti S., Pizarro T T., (2015), Crosstalk between type 3 innate lymphoid cells and the gut microbiota in inflammatory bowel disease, *Current Opinion in Gastroenterology*, November ; 31(6): 449–455.

Buela K A G., Omenetti S., Pizarro T T., (2015), Crosstalk between type 3 innate lymphoid cells and the gut microbiota in inflammatory bowel disease, *Current opinion in gastroenterology*, volume 31-6, p.449-455

Campbell N A., Reece J B., (2007), Biologie, *Editions du Renouveau Pédagogique Inc*, Chapitre 41, p.915-930

Candon S., Perez-Arroyo A P., Marquet C., Valette F., Foray A P., Pelletier B., Milani C., Ventura M., Bach J F., Chatenoud L., (2015), Antibiotics in Early Life Alter the Gut Microbiome and Increase Disease Incidence in a Spontaneous Mouse Model of Autoimmune Insulin-Dependent Diabetes, *Plos One*, May 13

Caprilli R., Frieri G., (2009), The dyspeptic macrophage 30 years later : An update in the pathogenesis of Crohn's disease, *Digestive and liver disease*, volume 41, p.166-168

Casanova J L., Abel L., (2009), Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages, *journal of experimental medicine*, volume 206-9, p.1839-1843

Chassaing B., Aitken J D., Malleshappa M., Vijay-kumar M., (2015), Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice, *Current protocols in immunology*, volume 104

Chassaing B., Koren O., Goodrich J K., Poole A C., Srinivasan S., Ley R E., Gewirtz A T., (2015), Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome, *Nature*, Vol 519, 5 march 2015, p.92

Cheifetz A S., (2013), Management of active Crohn disease, *JAMA*. May 22;309(20):2150-8. doi: 10.1001/jama.2013.4466.

Clevers H C., Bevins C L., (2013), Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts, *Annual Review of Physiology*, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183744

Constantinovits M., Sipos F., Molar B., Tulassay Z S., Muzes G y.,(2012), *Acta Physiologica Hungarica*, Volume 99 (3), pp. 344–352

Cosnes J., Gower- Rousseau C., Seksik P., Cortot A., (2011), Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases, *Gastroenterology*, vol 140, p. 1785-1794

Crohn B B., Ginzburg L., Oppenheimer G D., (1932), Regional ileitis, a pathologic and clinical entity, *JAMA*, 1932;99:1323-9.

Cui B., Feng Q., Wang H., Wang M., Peng Z., Li P., Huang G., Liu Z., Wu P., Fan Z., Ji G., Wang X., Wu K., Fan D., Zhang F., (2015), Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: Safety, feasibility, and efficacy trial results, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, volume 30, p.51–58

Davis-Richardson A G., Triplett E W., A model for the role of gut bacteria in the development of autoimmunity for type 1 diabetes, *Diabetologia* (2015) 58: p.1386–1393

Denson L A., Klein C., (2016), Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Bioactivity and Mucosal Homeostasis in Crohn's Disease: A Role for Genetic Variation, *Gastroenterology*, Oct;151(4):593-6

Dieckgraefe B., Korzenik J., (2002), Treatment of active Crohn's disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Lancet*, volume 360, chapitre 9344, p.1478-1480

Dominguez-Bello M G., Blaser M J., Ley R E., Knight R., (2011), Development of the Human Gastrointestinal Microbiota and Insights From High-Throughput Sequencing, *Gastroenterology* ;140:1713–1719

Dominguez-Bello M G., De Jesus-Laboy K M., Shen N., Cox L M., Amir A., Gonzalez A., Bokulich N A., Song S E., Hoashi M., Rivera-Vinas J I., Mendez K., Knight R., Clemente J C., (2016), Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer, *Nature medicine*, volume 22, number 3, march, p.250-254

Dranoff G., Crawford A D., Sadelain M., Ream B., Rashid A., Bronson R T., Dickersin G R., Bachurski C J., Mark E L., Whitsett J A., Mulligan R C., (1994), Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis, *Science*, volume 264, p.713-716

Dranoff G., GM-CSF-based cancer vaccines, (2002), *Immunological Reviews*, Oct;188:147-54.

Driver J P., Serreze D V., Chen Y G., (2011), Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease, *Seminars in Immunopathology*, volume 33, p.67-87

Duan L., Chen J., Zhang H., Yang H., Zhu P., Xiong A., Xia Q., Zheng F., Tan Zheng., Gong F., Fang M., (2012), Interleukin-33 Ameliorates Experimental Colitis through Promoting Th2/Foxp3+ Regulatory T-Cell Responses in Mice, *Molecular medicine*, volume 18, p. 753-761

Eberl G., (2005), Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway?, *Nature reviews immunology*, volume 5, may, p.413-420

Eckburg P B., Bik E M., Bernstein C N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S R., Nelson K E., Relman D A., (2005), Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora, *Science*, vol 308, 10 june, p.1635-1638

Egea L., Hirata Y., Kagnoff M F., (2010), GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, December ; 4(6): 723–731

Egea L., McAllister C S., Lakhdari O., Minev I., Shenouda S., Kagnoff M F., (2013), GM-CSF produced by non-hematopoietic cells is required for early epithelial cell proliferation and repair of injured colonic mucosa, *Journal of immunology*, volume 190-4, p.1702-1713

Eken A., Singh A K., Oukka M., (2014), Interleukin 23 in crohn's disease, *Inflammatory bowel disease*, volume 20, p.587-595

Eksteen B., Liaskou E., Adams D H., (2008), Lymphocyte Homing and Its Role in the Pathogenesis of IBD, *Inflammatory bowel disease*, volume 14, p.1298-1312

Elkord E., (2009), Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation, *Journal of Immunological Methods* 347, 87–90

Elliot T R., Hudspith B N., Rayment N B., Prescott N J., Petrovska L., Hermon-Taylor J., Brostoff J., Boussioutas A., Mathew C G., Sanderson J D., (2015), Defective macrophage handling of Escherichia coli in Crohn's disease, *Journal of gastroenterology and hepatology*, volume 30, p.1265-1274

Elson C O., Cong Y., Weaver C T., Schoeb T R., McClanahan T K., Fick R B., Kastelein R A., (2007), Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice, *Gastroenterology*. 132:2359–2370. [PubMed: 17570211]

Emani R., Asghar M N., Toivonen R., Lauren L., Soderstrom M., Toivola D M., Van Tol E A F., Hanninen A., (2013), Casein hydrolysate diet controls intestin al T cell activation, free radical production and microbial cōlonisation in NOD mice, *Diabetologia* 56:1781–1791

Fondation canadienne des maladies inflammatoires de l'intestin, (2008), Le fardeau des maladies inflammatoires de l'intestin au Canada, *Rapport final et recommandations*

Fumagalli S., Torri A., Papagna A., Citterio S., Mainoldi F., Foti M, (2016), IL-22 is rapidly induced by Pathogen Recognition Receptors Stimulation in Bone-Marrowderived Dendritic Cells in the Absence of IL-23, *Nature*, DOI: 10.1038/srep33900

Gallo R L., Hooper L V., (2012), Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine, *Nature reviews immunology*, volume 12, july, p.503-516

Gangi E., Vasu C., Cheatem D., Prabhakar B S., 2005, IL-10-Producing CD4CD25 Regulatory T Cells Play a Critical Role in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Induced Suppression of Experimental Autoimmune Thyroiditis, *Journal of Immunology*, 174:7006-7013

Gao S Q., Huang L D., Dai R J., Chen D D., Hu W J., Shan Y F., (2015), Neutrophil-lymphocyte ratio : a controversial marker in predicting Crohn's disease severity, *International journal of clinical experiment pathology*, volume 8-11, p.14779-14785

Gaudrea S., Guindi C., Ménard M., Besin G., Dupuis G., Amrani A., (2007), Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Prevents Diabetes Development in NOD Mice by Inducing Tolerogenic Dendritic Cells that Sustain the Suppressive Function of CD4 CD25 Regulatory T Cells, *Journal of immunology*, 179:3638-3647

Gaudreau S., Guindi C., Ménard M., Benabdallah A., Dupuis G., Amrani A., (2010), GM-CSF induces bone marrow precursors of NOD mice to skew into tolerogenic dendritic cells that protect against diabetes, *Cellular Immunology* volume 265, p. 31–36

Ghazi L J., (2016), Crohn disease, Medscape, [9 décembre 2016], <http://emedicine.medscape.com/article/172940-overview>

Gibson P R., Shepherd S J., (2005), Personal view: food for thought – western lifestyle and susceptibility to Crohn's disease. The FODMAP hypothesis, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*; 21: 1399–1409

Gracie J A., Robertson S E., McInnes I B., (2003), Interleukin-18, *Journal of Leukocyte Biology* Volume 73, February

Grasa L., Abecia L., Forcen R., Castro M., Garcia de Jalon J A., Latorre E., Alcalde A I., Murillo M D., (2015), Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility, *Microbial Ecology*, Oct;70(3):835-48

Guaraldi F., Salvatori G., (2012), Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Volume 2, Article 94

Guinane C M., Cotter P D., (2013), Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ, *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(4) 295–308

Hamilton J A., (2008), Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity., *Nature reviews of immunology*, volume 8, july, p.533-544

Han X., Gilbert S., Groschwitz K., Hogan S., Jurickova I., Trapnell B., Samson C., Gully J., (2010), Loss of GM-CSF signalling in non-haematopoietic cells increases NSAID ileal injury, *Gut*, volume 59, chapitre 8, p. 1066-1078

Hanson M., Hixon J., Li W., Felber B., Anver M., Stewart C., Janelins B., Datta S., Shen W., McLean M., Durum S., (2014), Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice, *Gastroenterology*. Volume 146 p.210–221

Hayee B., Rahman F Z., Tempero J., McCartney S., Bloom S L., Segal A W., Smith A M., (2011), The neutrophil respiratory burst and bacterial digestion in Crohn's disease, *digestive disease*, volume 56-5, p.1482-1488

Hayes P A., Fraher M., Quigley E M M., (2014), Irritable Bowel Syndrome: The Role of Food in Pathogenesis and Management, *Gastroenterology & Hepatology* Volume 10, Issue 3 March

Hedin C., van der Gast C J., Rogers G B., Cuthbertson L., McCartney S., Stagg A J., Lindsay J O., Whelan K., (2016), Siblings of patients with Crohn's disease exhibit a biologically relevant dysbiosis in mucosal microbial metacommunities, *Gut*. Jun;65(6):944-53. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308896.

Henao-Mejia J., Elinav E., Jin C., Hao L., Mehal W Z., Strowig., Thaiss C A., Kau A L., Eisenbarth S C., Jureczak M J., Camporez J P., Shulman G I., Gordon J I., Hoffman H M., Flavell R A., (2012), Inflammasome-mediated dysbioses regulates progression of NAFLD and obesity, *Nature*, volume 482, 9 february, p.179-186

Hepworth M R., Fung T C., Masur S H., Kelsen J R., McConnell F M., Dubrot J., Withers D R., Hugues S., Farrar M A., Reith W., Eberl G., Baldassano R N., Laufer T M., Elson C O., Sonnenberg G F., (2015), Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4+ T cells, *Science*, 23 April, p.1-11

Hernandez G., Appleyard C., (2003), Bacterial load in animal models of acute and chronic 'reactivated' colitis. *Digestion*, volume 67, p.161-169

Hirata Y., Egea L., Dann S., Eckmann L., Kagnoff M., (2010), GM-CSF-

facilitated dendritic cell recruitment and survival govern the intestinal mucosal response to a mouse enteric bacterial pathogen, *Cell host microbe*, volume 7, chapitre 2, p. 151-163

Hochweller K., Striegler J., Hammerling G J., Garbi N., (2008), A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells, *European journal of immunology*, volume 38, p.2776-2783

Honda K., Nakamura K., Matsui N., Takahashi M., Kitamura Y., Mizutani T., Harada N., Nawata H., Hamano S., Yoshida H., (2005), T helper 1-inducing property of IL-27/WSX-1 signaling is required for the induction of experimental colitis, *Inflammatory bowel diseases*, volume 11, p.1044–1052

Hou J K., Lee D., Lewis J., (2014), Perspectives in clinical gastroenterology and hepatology, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12:1592–1600

Hume D A., (2008), Macrophages as APC and the dendritic cell myth, *journal of immunology*, volume 181, p.5829-5835

Hunter C A., Kastelein R., (2012), Interleukin-27: Balancing Protective and Pathological Immunity, *Immunity*, volume 37, p.960-969

Jostins L., Ripke S., Weersma R K., Duerr R H., McGovern D P., Hui K Y., Lee J C., Schumm L P., Sharma Y., Anderson C A., Essers J., Mitrovic M., Ning K., Cleyneen I., Theatre E., Spain S L., Raychaudhuri S., Goyette P., Wei Z., Abraham C., Achkar J P., Ahmad T., Amininejad L., Ananthakrishnan A N., Andersen V., Andrews J M., Baidoo L., Balschun T., Bampton P A., Bitton A., Boucher G., Brand S., Büning C., Cohain A., Cichon S., D'Amato M., De Jong D., Devaney K L., Dubinsky M., Edwards C., Ellinghaus D., Ferguson L R., Franchimont D., Fransen K., Gearry R., Georges M., Gieger C., Glas J., Haritunians T., Hart A., Hawkey C., Hedl M., Hu X., Karlsen T H., Kupcinskis L., Kugathasan S., Latiano A., Laukens D., Lawrance I C., Lees C W., Louis E., Mahy G., Mansfield J., Morgan A R., Mowat C., Newman W., Palmieri O., Ponsioen C Y., Potocnik U., Prescott N J., Regueiro M., Rotter J I., Russell R K., Sanderson J D., Sans M., Satsangi J., Schreiber S., Simms L A., Sventoraityte J., Targan S R., Taylor K D., Tremelling M., Verspaget H W., De Vos M., Wijmenga C., Wilson D C., Winkelmann J., Xavier R J., Zeissig S., Zhang B., Zhang C K., Zhao H.; International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Silverberg M S., Annesse V., Hakonarson H., Brant S R., Radford-Smith G., Mathew C G., Rioux J D., Schadt E E., Daly M J., Franke A., Parkes M., Vermeire S., Barrett J C., Cho J H., (2012), Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease *Nature*, volume 491, 1 november, p.119-124

Jubinsky P T., Laurie A S., Nathan D G., Yetz-Aldepe J., Sieff C A., (1994), Expression and Function of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor α Subunit, *Blood Journal*, Vol 84, No 12 (December 15): pp 4174-4185

Khashan A S., Kenny L C., Lundholm C., Kearney P M., Gong T., Almqvist C., (2014), Mode of Obstetrical Delivery and Type 1 Diabetes: A Sibling Design Study, *Pediatrics*, Volume 134, Number 3, September

Kim G., Shinnakasu R., Saris C., Cheroutre H., Kronenberg M., (2013), A novel role for IL-27 in mediating the survival of activated mouse CD4 T lymphocytes, *Journal of Immunology*, volume 190, p.1510–1518

Ko Y., Butcher R., Leong R. W., (2014), Epidemiological studies of migration and environmental risk factors in the inflammatory bowel diseases, *World Journal of Gastroenterology*, February 7; 20(5): 1238-1247

Korzenik J., Dieckgraefe B., Valentine J., Hausman D., Gilbert M., (2005) Sargramostim for active Crohn's disease., *New England Journal Medecine*, volume 352, chapitre 21, p. 2193–2201

Krakovski M., Abdelmalik R., Mocnik L., Krah T., Sarvetnick N., (2002), Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) recruits immune cells to the pancreas and delays STZ-induced diabetes, *Journal of Pathology*, 196: 103–112

Lane P J L., McConnell F M., Withers D., Gaspal F., Saini M., Anderson G, (2009), Lymphoid tissue inducer cells: bridges between the ancient innate and the modern adaptive immune systems, *Nature Mucosal Immunology*, Volume 2, number 6, November, p.472-477

Lang R A., Metcalf D., Cuthbertson R A., Lyons I., Stanley E., Kelso A., Kannourakis G., Williamson D J., Klintworth G K., Gonds T J., Dunn A R., (1987), Transgenic Mice Expressing a Hemopoietic Growth Factor Gene (GM-CSF) Develop Accumulations of Macrophages, Blindness, and a Fatal Syndrome of Tissue Damage, *Cell*, volume 51, p.675-686

Levine A P., Segal A W., (2013), What is wrong with granulocytes in inflammatory bowel diseases?, *Digestive Diseases*, volume 31-0, p.321-327

Li C., Kuemmerle J F., (2014), The mechanisms that mediate the development of fibrosis in patients with Crohn's Disease , *Inflammatory bowel disease*, volume 20-7, p.1250-1258

Lui J., Cao X., (2015), Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review, *Journal of Autoimmunity* 63 (2015) 1-12

Lutz M B., Suri R M., Niimi M., Ogilvie A L., Kukutsch N A., Rössner S., Schuler G., Austyn J M., (2000), Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*, *European journal of immunology*, Jul;30(7):1813-22.

Mabbot N A., Donaldson D S., Ohno H., Williams I R., Mahajan A., (2013), Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium, *Nature*, volume 6 number 4, july, p.666-677

Magno P., Jimenez C., Ortiz Z., Torres E., (2010), Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (sargramostim) as an alternative therapy for fistulizing Crohn's disease. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, volume 29, chapitre 1, p. 60-65

Maloy K J., Powrie F., (2011), Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease, *Nature*, Volume 474, p.298-306.

Maloy K., (2007), Induction and regulation of inflammatory bowel disease in immunodeficient mice by distinct CD4⁺ T-cell subsets, *Methods in molecular biology*, volume 380, p.327-335

Marieb E N., Hoehn K., (2010), Anatomie et physiologie humaines, *Editions du Renouveau Pédagogique Inc*, quatrième édition, chapitre 23, p. 991-992

Marietta E., Rishi A., Taneja V., (2015), Immunogenetic control of the intestinal microbiota, *Immunology*, Jul;145(3):313-22. doi: 10.1111/imm.12474

McGeachy M J., (2011), GM-CSF: the secret weapon in the TH17 arsenal, *Nature immunology*, Volume 12, number 6, June, p.521-522

McWilliams I L., Rajbhandari R., Nozell S., Benveniste E., Harrington L E., (2015), Stat4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE, *journal of neuroinflammation*, volume 12 p.120-128

Mehta H M., Malandra M., Corey S J., (2015), G-CSF and GM-CSF in Neutropenia, *Journal of Immunology*, August 15; 195(4): 1341–1349

Mejia-Leon M E., Calderon de la Barca A M., (2015), Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution, *Nutrients*, volume 7, p.9171–9184

Meka R R., Venkatesha S H., Dubics S., Acharya B., Moudgil K D., (2015), IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic Potential, *Autoimmun reviews*, volume 14-12, p.1131-1141

Melli L C F L, Carmo-Rodrigues M S D., Araujo-Filho H B., Solé D., de Moraes M B., (2015), Intestinal microbiota and allergic diseases: a systematic review, *Allergologia et Immunopathologia*, . <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2015.01.013>

Molloy M J., Grainger J R., Bouladoux N., Hand T W., Koo L Y., Naik S., Quinones M., Dzutsev A K., Gao J L., Trinchieri G., Murphy P M., Belkaid Y., (2013), Intraluminal Containment of Commensal Outgrowth in the Gut during Infection-Induced Dysbiosis, *Cell Host & Microbe* 14, 318–328, September 11

Monteleone G., Pallone F., Macdonald T T., (2011) Emerging immunological targets in inflammatory bowel disease, *Current opinion in pharmacology*, volume 11, p.640-645

Morel P A., Turner M S., (2011), Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance, *Immunologic Research*, 50:124–129

Moreno-Indias I., Cardona F., Tinahones F J., Quipo-Ortuno M I., (2014), Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus, *Frontiers in microbiology*, volume 5, article 190, april

Mortha A., Chudnovskiy A., Hashimoto D., Bogunovic., Spencer S P., Belkaid Y., Merad M., (2014), Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis, *Science*, volume 343, 28 march

Muzaki A., Tetlak P., Sheng J., Loh S., Setiagani Y., Poidinger M., Zolezzi F., Karjalainen., Ruedl C., (2016), Intestinal CD103⁺ CD11b⁺ dendritic cells restrain colitis via IFN- γ -induced anti-inflammatory response in epithelial cells, *Mucosal immunology*, volume 9, chapitre 2, p.336-351

Nakata K., Kanazawa H., Watanabe M., (2006), Why does the autoantibody against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cause lesions only in the lung?, *Respirology*, volume 11, p.65-69

Neill D R., Wong S H., Bellosi A., Flynn R J., Daly M., Langford T K A., Bucks C., Kane C M., Fallon P G., Pannell R P., Jolin H E., McKenzie A N J., (2010), Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity, *Nature*, Volume 464, 29 april, p.1367-1371

Neurath M., Fuss I., Kelsall B., Stuber E., Strober W., (1995), Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *Journal of*

Experimental Medecine, volume 182, p.1281–1290

Nielsen D S., Krych L., Buschard K., Hansen C H F., Hansen A K., (2014), Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes, *FEBS Letters* 588, p.4234–4243

Nieuwenhuis E., Neurath M., Corazza N., Iijima H., Trgovcich J., Wirtz S., Glickman J., Bailey D., Yoshida M., Galle P., Kronenberg M., Birkenbach M., Blumberg R., (2002), Disruption of T helper 2- immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 99 p.16951–16956.

Novick D., Kim S., Kaplanski G., Dinarello C A., (2013), Interleukin-18, more than a Th1 cytokine, *Seminars in immunology*, volume 25, p.439-448

O'Connor E M., (2013), The role of gut microbiota in nutritional status, *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, Sep;16(5):509-16

Oertli M., Sunquist M., Hitzler I., Engler D B., Arnold I C., Reuter S., Maxeiner J., Hansson M., Taube C., Quiding-Jarbrink M., Muller A., (2012), DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection, *The Journal of Clinical Investigation*, volume 122, number 3, p.1082-1096

Opipari A., Franchi L., (2015), Role of Inflammasomes in Intestinal Inflammation and Crohn's Disease, *Inflammatory bowel disease*, volume 21, p.171-181

Panja A., Goldberg S., Eckmann L., Krishen P., Mayer L., (1998), The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells, *Journal of immunology*, volume 161, chapitre 7, p. 3675-3684

Parham P., (2009), The immune system, *Garland Science*, third edition, chapitre 13, p.403-433

Perry R J., Peng L., Barry N A., Cline G W., Zhang D., Cardone R L., Petersen K F., Kibbey R G., Goodman A L., Shulman G I., (2016), Acetate mediates a microbiome-brain- β - cell axis to promote metabolic syndrome, *Nature*, volume 534, 9 june, p.213-217

Perse M., Cerar A., (2012), Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks, *Journal of biomedecine and biotechnology*, Volume 2012, Article ID 718617

Persson E K., Scott C L., Mowat A M., Agace W W., (2013), Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria : Ontogeny and function, *European Journal of Immunology*. 43: 3098–3107

Pluznick J L., (2014), Gut microbes and host physiology: what happens when you host billions of guests?, *Frontiers in endocrinology*, volume 5, article 91, june

Puddu A., Sanguineti R., Montecucco F., Viviani G L., (2014), Evidence for the Gut Microbiota Short-Chain Fatty Acids as Key Pathophysiological Molecules Improving Diabetes, *Mediators of Inflammation*, Volume 2014, Article ID 162021

Rath H., Schultz M., Freitag R., Dieleman L., Li F., Linde H., Schölmerich J., Sartor R., (2001), Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice, *Infection and Immunity*, volume 69 p.2277-2285.

Rigoni R., Fontana E., Guglielmetti S., Fosso B., D'Erchia A M., Maina V., Taverniti V., Castiello M C., Mantero S., Pacchiana G., Musio S., Pedotti R., Selmi C., Mora J R., Pesole G., Vezzoni P., Poliani P L., Grassi F., Villa A., Cassani B., (2016), Intestinal microbiota sustains inflammation and autoimmunity induced by hypomorphic RAG defects, *Journal of experimental medicine*, volume 213-3, p.355-375

Roberts-thomson I C., Fon J., Uylaki W., Cummins A G., Barry S., (2014), Cells, cytokines and inflammatory bowel disease : a clinical perspective, *Expert review of gastroenterology & hepatology*, volume 5-6, p.703-716

Robinette M L., Fuchs A., Cortez V S., Lee J S., Wang Y., Durum S K., Gilfillan S., Colonna M., the Immunological Genome Consortium, (2015), Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets, *Nature immunology*, doi:10.1038/ni.3094

Robinette M L., Fuchs A., Cortez V S., Lee J S., Wang Y., Durum S K., Gilfillan S., Colonna M., the immunological genome consortium., (2014), Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets, *Nature immunology*, doi:10.1038/ni.3094

Rune I., Rolin B., Larsen C., Nielsen D S., Kanter J E., Bornfeldt K E., Lykkesfeldt J., Buschard K., Kirk R K., Christoffersen B., Fels J J., Josefsen K., Kihl P., Hansen A K., (2016), Modulating the Gut Microbiota Improves Glucose Tolerance, Lipoprotein Profile and Atherosclerotic Plaque Development in ApoE Deficient Mice, *PLoS One*, January 22;11(1)

Sainathan S., Hanna E., Gong Q., Bishnupuri K., Luo Q., Colonna M., White F., Croze E., Houchen C., Anant S., Dieckgraefe B., (2008) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis, *Inflammatory bowel disease*, volume 14, chapitre 1, p.88-90

Sasaoka T., Ito M., Yamashita J., Nakajima K., Tanaka I., Narita M., Hara Y., Hada K., Takahashi M., Ohno Y., Matsuo T., Kaneshiro Y., Tanaka H., Kaneko K., (2011) Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiology*, volume 300 p.568–576

Sato K., Fujita S., (2007), Dendritic Cells-Nature and Classification, *Allergy International* Vol 56, No3, 183-191

Satoh-Takayama N., Serafini N., Verrier T., Rekiki A., Renaud J C., Frankel G., Di Santo J P., (2014), The Chemokine Receptor CXCR6 Controls the Functional Topography of Interleukin-22 Producing Intestinal Innate Lymphoid Cells, *Immunity*, volume 41, November 20, 776–788

Scandella E., Bolinger B., Lattmann E., Miller S., Favre S., Littman D R., Finke D., Luther S A., Junt T., Ludewig B., (2008), Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone, *Nature immunology*, volume 9, number 6, p.667-675

Schaubeck M., Clavel T., Calasan J., Lagkouvardos I., Haange S B., Jehmlich N., Basic M., Dupont A., Horneft M., Von Bergen N., Bleich A., Haller D., (2015), Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn' s disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence, *Gut*; 0:1 –13. doi:10.1136/gutjnl-2015-309333

Schwender B., Floch., (2014), Should FODMAP Withdrawal be Tried in Inflammatory Bowel Disease Patients With Irritable Bowel Syndrome?, *Journal of Clinical Gastroenterology*, Volume 48, Number 5, May/June 2014 p.393-394

Seymour J F., Lieschke G J., Grail D., Quilici C., Hodgson G., Dunn A R., (1997), Mice Lacking Both Granulocyte Colony-Stimulating Factor (CSF) and Granulocyte-Macrophage CSF Have Impaired Reproductive Capacity, Perturbed Neonatal Granulopoiesis, Lung Disease, Amyloidosis, and Reduced Long-Term Survival, *Blood*, volume 8, p.3037-3049

Shen C., Landers C J., Derkowski C., Elson C O., Targan S R., (2008), Enhanced CBir1-specific innate and adaptive immune responses in Crohn's disease, *Inflammatory Bowel Diseases*, December ; 14(12): 1641–1651. doi:10.1002/ibd.20645.

Shi Y., Liu C H., Roberts A I., Das J., Xu G., Ren G., Zhang Y., Zhang L., Yuan ZR., Tan H S., Das G., Devadas S., (2006), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know, *Cell Research* (2006)16: 126-133

Sim W J., Ahl P J., Connolly J E., (2015), Metabolism Is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function, *Mediators of Inflammation*, Volume 2016, Article ID 2636701

Sonnenberg G F., Artis D., (2015), Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation, *Nature medicine*, volume 21, number 7, July, p.698-708

Strober W., Fuss I J., (2011), Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD, *Gastroenterology*. May ; 140(6): 1756–1767

Sun J., Furio L., Mecheri R., Van der Does A M., Lundeberg E., Saveanu L., Chen Y., Van Endert P., Agerberth B., Diana J., 2015, Pancreatic b-Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota, *Immunity*, volume 43, 18 august, p.304-317

Takazoe M., Matsui T., Motoya S., Matsumoto T., Hibi T., Watanabe M., (2009), Sargramostim in patients with Crohn's disease: results of a Phase 1–2 study, *Journal of gastroenterology*, volume 44, chapitre 6, p.535-543

Tawfik A., Flanagan P K., Campbell B J, (2014), Escherichia coli-host macrophage interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *World journal of gastroenterology*, volume 20-27, p.8751-8763

Thorburn A N., McKenzie C I., Shen S., Stanley D., Macia L., Mason L J., Roberts L K., Wong C H Y., Shim R., Robert R., Chevalier N., Tan J K., Marino E., Moore R J., Wong L., McConville M J., Tull D L., Wood L G., Murphy V E., Mattes J., Gibson P G., Mackay C R., (2015), Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites, *Nature communications*, Jun 23;6:7320. doi: 10.1038/ncomms8320

Tittel A P., Heuser C., Ohliger C., Llanto C., Yona S., Hammerling G J., Engel D R., Garbi N., Kurts C., (2012), Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice, *Nature methods*, volume 9-4, p.385-391

To N., Gracie D J., Ford A C., (2016), Systematic review with meta-analysis: the adverse effects of tobacco smoking on the natural history of Crohn's disease, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43: 549–561

Tonucci L B., Dos Santos K O., Ferreira C L D L F., Ribeiro S M R., De Oliveira L L., Martino H S D., (2015), Clinical Application of Probiotics in Diabetes Mellitus: Therapeutics and New Perspectives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Oct 25:0, <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.934438>

Tortora G J., Derrickson B., (2009), Éléments d'anatomie et de physiologie, *Editions du Renouveau Pédagogique Inc*, chapitre 19, p.472-494

Tremaroli V., Backhed F., (2012), Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism, *Nature*, volume 489, 13 september, p.242-249

Troy A., Zaph C., Du Y., Taylor B., Guild K., Hunter C, Saris C., Artis, D., (2009) IL-27 regulates homeostasis of the intestinal CD4+ effector T cell pool and limits intestinal inflammation in a murine model of colitis, *Journal of Immunology*, volume 183, p.2037–2044

Valentine J., Fedorak R., Feagan B., Fredlund P., Schmitt R., Ni P., Humphries T., (2009), Steroid-sparing properties of sargramostim in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, Phase 2 study, *Gut*, volume 58, chapitre 10, p. 1354-1362

Van Assche G., Vermeire S., Rutgeerts P., (2010), The potential for disease modification in Crohn's disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 79–85

Van de Laar L., Coffer P J., Woltman A M., (2012), Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy, *Blood Journal*, 12 april 2012 volume 119, number 15

Van Nieuwenhuijze A., Koenders M., Roeleveld D., Sleeman M A., Van den Berg W., Wicks I P., (2013), GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases, *Molecular Immunology* 56, 675–682

Villarino A., Artis D., Bezbradica J., Miller O., Saris C., Joyce S., Hunter C., (2008), IL-27R deficiency delays the onset of colitis and protects from helminth-induced pathology in a model of chronic IBD, *International immunology*, volume 20, p. 739–752

Villarreal D O., Weiner D B., (2014), Interleukin 33: a switch-hitting cytokine, *Current Opinion in Immunology*, volume 28 p.102 –106

Vinh D C., Beher M A., (2014), Crohn's as an immune deficiency : from apparent paradox to evolving paradigm, *Expert review of gastroenterology & hepatology*, volume 9-1, p.17-30

Visperas A., Do J., Bulek K., Li X., Min B., (2014), IL-27, targeting antigen-presenting cells, promotes Th17 differentiation and colitis in mice, *Mucosal immunology* volume 7 p.625–633

Volynets V., Reichold A., Bardos G., Rings A., Bleich A., Bischoff S C., (2016), Assessment of the intestinal barrier with five different permeability tests in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice, *Digestive disease science*, volume 61, p.737-746

Waisman A., Lukas D., Clausen B J., Yogev N., (2016), Dendritic cells as gatekeepers of tolerance, *Seminars in Immunopathology*, DOI 10.1007/s00281-016-0583-z

Waler J A., Barlow J L., McKenzie A N J., (2013), Innate lymphoid cells — how did we miss them?, *Nature reviews immunology*, volume 13, February, p.75-87

Wan C K., Oh J., Li P., West E E., Wong E A., Andraski A B., Spolski R., Yu Z X., He J., Kelsall B L., Leonard W J., (2013), The Cytokines IL-21 and GM-CSF have Opposing Regulatory Roles in the Apoptosis of Conventional Dendritic Cells, *Immunity*, March 21; 38(3): 514–527.

Wing K., Sakaguchi S., (2010), Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity, *Nature immunology*, volume 11, number 1, January, p.7-13

Xu X R., Liu C Q., Feng B S., Liu Z J., (2014), Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease, *World journal of gastroenterology*, volume 20-12, p.3255-3264

Xu Y., Hunt N., Bao S., (2008), The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation , *Cell research*, volume 18, chapitre 12, p. 1220-1229

Xu Y., Hunt N H., Bao S., (2008), The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation, *Cell research*, volume 18, p.1220-1229

Yamamoto-Furusho J K., Korzenik J R., (2006), Crohn's disease: innate immunodeficiency?, *World journal of gastroenterology*, volume 12-42, p.6751-6755

Yin Y., Qin T., Wang X., Lin J., Yu Q., Yang Q., (2014), *Nature mucosal immunology*, . d o i :10.1038/mi.2014.110

Zerif E., Maalem A., Gaudreau S., Guindi C., Ramzan M., Véroneau S., Gris D., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Mourad W., Dupuis G., Amrani A., (2016), Constitutively active Stat5b signaling confers tolerogenic functions to dendritic cells of NOD mice and halts diabetes progression, *Journal of Autoimmunity*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.09.001>

ANNEXES

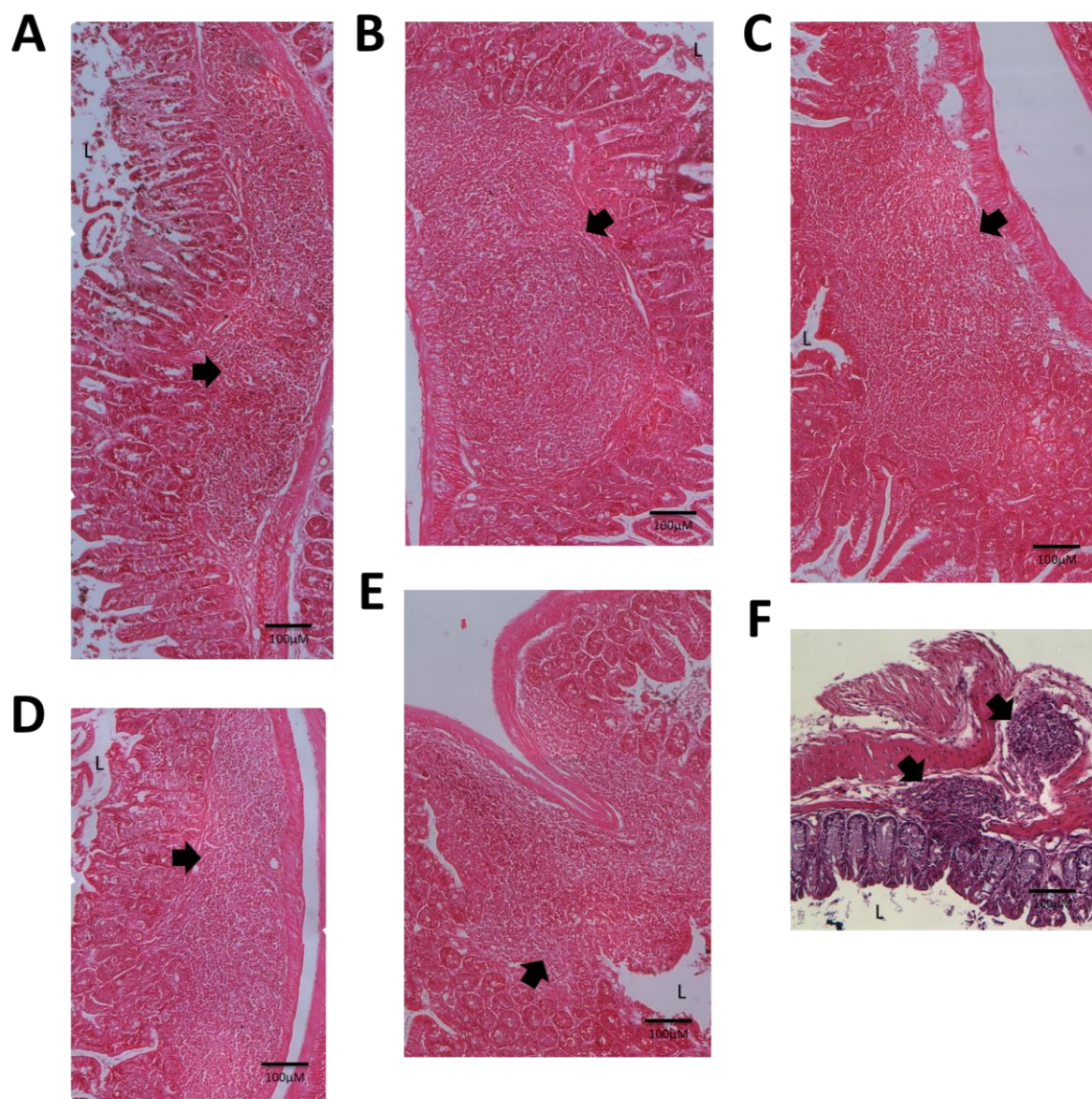


Figure 15 : Montage photographique représentatif des lésions chez les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}.Rag1^{-/-}. Les souris C57BL/6.Csf2^{-/-}.Rag1^{-/-} ont de larges foyers d'inflammation intestinale (A,B,C,D et E) et colonique (F) variant entre 500 μM et 2000 μM de longueur, tel qu'indiqués ici par les flèches et où L indique la position de la lumen associée. Il est à remarquer que les foyers d'inflammation intestinaux sont beaucoup plus gros que ceux coloniques. De même, les foyers d'inflammation intestinaux des souris C57BL/6.Csf2^{-/-}.Rag1^{-/-} sont beaucoup plus gros que ceux des souris C57BL/6.Csf2^{+/+}.Rag1^{-/-}.